目次

1.　まとめ……6
2.　単回投与毒性……11
2.1　エプコリタマブのカニクイザルでの静脈内持続投与による単回投与毒性試験及び回復性試験（[redacted]529668）……11
2.2　プライミングドーズを伴う単回静脈内投与……13
2.3　単回皮下投与……13
3.　反復投与毒性……14
3.1　エプコリタマブ：カニクイザルでの静脈内持続投与又は皮下投与による用量設定試験及び回復性試験（[redacted]501775）……14
3.2　エプコリタマブ:カニクイザルでの 5 週間静脈内持続投与及び皮下投与毒性試験並びに 6 週間回復性試験（生物学的利用率、局所刺激性評価を含む）（[redacted]503484）……18
3.3　エプコリタマブ：13 週間反復投与毒性試験……22
4.　遺伝毒性……23
5.　がん原性……23
6.　生殖発生毒性……23
7.　局所刺激性……24
8.　その他の毒性試験……24
8.1　動物種の確認試験……24
8.2　免疫原性……25
8.3　溶血性……25
8.4　サイトカイン放出……26
8.5　組織交差反応性試験……27
9.　考察及び結論……29
10.　参考文献……30

表目次

Table 1　エプコリタマブ及び関連抗体一覧 5
Table 2　エプコリタマブの毒性試験 8
Table 3　エプコリタマブの雌カニクイザルでの単回静脈内持続投与毒性試験の試験デザイン ... 11
Table 4　雌カニクイザルに静脈内及び皮下投与したときの用量設定試験の試験デザイン 15
Table 5　雌雄カニクイザルでの主要な GLP 適用反復投与毒性試験の試験デザイン 18
Table 6　エプコリタマブの TK パラメーターの概要 20
Table 7　抗エプコリタマブ抗体陽性動物の概要 25
Table 8　サイトカイン濃度の中央値 26

図目次

Figure 1　エプコリタマブの模式図 6

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
ADCP	antibody-dependent cell-mediated phagocytosis	抗体依存性細胞貪食
AUC	area under the concentration-time curve	薬物濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{0-t}	area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration	0 時間から最終定量可能時点までの AUC
AUC_{0-7d}	area under the concentration-time curve from time zero to time t=7 days	投与後 7 日までの AUC
CD	cluster of differentiation	CD 分類
CDC	complement-dependent cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CD3	surface antigen on T cells, subunit of the T cell receptor complex	T 細胞上の表面抗原、T 細胞受容体複合体のサブユニット
CD4	T cell surface antigen specific for the T helper cell subpopulation	ヘルパーT 細胞サブセットに特異的な T 細胞表面抗原
CD8	surface antigen present on most cytotoxic T cells and NK cells	ほぼすべての細胞傷害性 T 細胞及び NK 細胞に存在する表面抗原
CD19	surface antigen, pan-B cell receptor protein	表面抗原、汎 B 細胞受容体タンパク質
CD20	surface antigen, pan-B cell marker	表面抗原、pan-B 細胞マーカー
C_{max}	the maximum observed concentration observed after dosing	最高濃度
[redacted]	[redacted]	－
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EC_{20}	20% effective concentration	20%効果濃度
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
EC_{90}	90% effective concentration	90%効果濃度
EFD	embryo-fetal development	胚・胎児発生
EMA（旧 EMEA）	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
Fc	fragment crystallizable	－
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
FcγR	Fc gamma receptor	Fcγ 受容体
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FEA	inertness mutations L234F/L235E/D265A	不活性変異 L234F、L235E、D265A
FEAL	L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody mutations	L234F/L235E/D265A 不活性、F405L DuoBody 変異
FEAR	L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody mutations	L234F/L235E/D265A 不活性、K409R DuoBody 変異
FITC	fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
GALT	gut-associated lymphoid tissue	腸管関連リンパ組織
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
HEK	human embryonic kidney cell	ヒト胎児腎細胞
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IFN	interferon	インターフェロン
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IL	interleukin	インターロイキン
IV	intravenous	静脈内
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MAD	mutual acceptance of data	データ相互受け入れ制度
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	単球走化性タンパク質-1
NA	not applicable	該当せず
$nAUC_{0\text{-}7d}$	$AUC_{0\text{-}7d}$ normalized for the dose received	投与量補正した $AUC_{0\text{-}7d}$
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PD-1	programmed cell Death 1	プログラム細胞死-1
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency	医薬品医療機器総合機構
Q1W	once weekly	週 1 回
SC	subcutaneous	皮下
SEB	Staphylococcal enterotoxin B	ブドウ球菌エンテロトキシン B
TCR	tissue cross-reactivity	組織交差反応性
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	time after dosing at which the maximum observed concentration is observed	最高濃度到達時間
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
V_D	apparent volume of distribution	見かけの分布容積
V_{ss}	apparent volume of distribution at steady state	定常状態での見かけの分布容積

化合物の命名法

エプコリタマブの開発中、最終製品を構成する 2 つの抗体成分及び最終製品には、異なる名称及び製品コードを使用した。さらに、開発プログラム中の様々な試験で対照抗体を評価した。Module 2.6.6 及び 2.6.7 にはエプコリタマブの結果のみを要約した。非臨床試験の報告書、モジュール及び要約の確認を容易にするために Table 1 にエプコリタマブ及び関連抗体一覧を示す。

Table 1　エプコリタマブ及び関連抗体一覧

Product Code	Nonclinical Code	Antibody
Epcoritamab	DuoBody-CD3xCD20; GEN3013; BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR	Bispecific IgG1 antibody that contains a CD3-specific Fab arm, a CD20-specific Fab arm, and with Fc silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone
NA	Epcoritamab-FITC; DuoBody-CD3xCD20-FITC; GEN3013-FITC; BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR-FITC	FITC-labeled bispecific IgG1 antibody that contains a CD3-specific Fab arm, a CD20-specific Fab arm and with Fc silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone
NA	DuoBody-ctrlxCD20; BisG1-b12-FEAL/7D8-FEAR	Bispecific IgG1 antibody that contains a CD20 specific Fab arm identical to epcoritamab, a non-binding control (ctrl) Fab arm, and with Fc silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone
3005a	IgG1-CD3-FEAL; IgG1-huCACAO-FEAL	Bivalent CD3-specific IgG1 mAb with Fc silencing (FEA) and DuoBody (F405L) mutations in the Fc backbone; parental antibody for epcoritamab
NA	IgG1-CD3; IgG1-huCACAO	Bivalent CD3-specific IgG1 mAb
NA	IgG1-ctrl-FEAR-FITC; IgG1-b12-LFLEDA-K409R-FITC	FITC-labeled bivalent non-binding control IgG1 antibody, with Fc silencing (FEA) and DuoBody (K409R) mutations in the Fc backbone

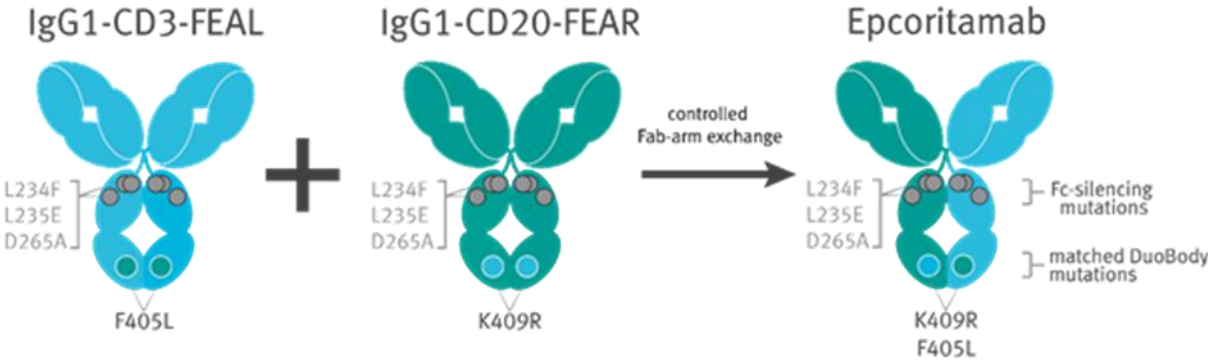
CACAO = cross-reactive anti-CD3 antibody one; CD = cluster of differentiation; ctrl = control [non-binding control Fab arm derived from the anti-human immunodeficiency virus (HIV) glycoprotein 120 (gp 120) antibody IgG1-b12 (Barbas et al, 1993)]; Fab = fragment antigen binding; Fc = fragment crystallizable; FEA = inertness mutations L234F/L235E/D265A; FEAL = L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody mutations; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody mutations; FITC = fluorescein isothiocyanate; IgG = immunoglobulin G; mAb = monoclonal antibody; NA = not applicable

1. まとめ

エプコリタマブは、T 細胞抗原 CD3 及び B 細胞抗原 CD20（Engelberts et al, 2020）を認識する IgG1 二重特異性抗体であり、CD20 を発現する B 細胞性悪性腫瘍の皮下投与治療薬として AbbVie 社とジェンマブ社により共同開発されている。エプコリタマブは、GEN3013、DuoBody®-CD3xCD20 及び BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR（Table 1）としても知られているが、毒性試験の概要文及び概要表中ではエプコリタマブとして記載している。

エプコリタマブは、ヒト IgG1 抗体に典型的な IgG1 構造及び生化学的特性を有する。エプコリタマブは、ヒト型抗 CD20 モノクローナル抗体（monoclonal antibody、mAb）7D8（Teeling et al, 2004; Teeling et al, 2006）とカニクイザルの CD3ε と交差反応性を示すヒト化抗 CD3ε mAb（Pessano et al, 1985）との間で制御された Fab アーム交換により得られる（Figure 1）。各親抗体は、DuoBody®分子の作製に必要な相補的変異（F405L 又は K409R）のそれぞれ 1 つを含む（Labrijn et al, 2013; Labrijn et al, 2014）。親抗体の Fc ドメインに 3 つの追加の不活性変異（L234F、L235E 及び D265A）を導入し（FEA の変異）、不活性化 Fc を得た（Engelberts et al, 2020）。

Figure 1　エプコリタマブの模式図



Schematic representation of controlled fragment antigen binding (Fab)-arm exchange of parental anti-CD3ε (IgG1-CD3-FEAL, 3005a) and parental anti-CD20 (IgG1-CD20-FEAR, 3001d) antibodies to obtain epcoritamab.
CD = cluster of differentiation; IgG = immunoglobulin G; FEAL = L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody mutations; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody mutations
Source (Engelberts et al, 2020).

エプコリタマブは CD3 及び CD20 に効率的に結合し、低ナノモル範囲での 50%効果濃度（50% effective concentration、EC_{50}）（フローサイトメトリー）及び親和性を示した。エプコリタマブは、CD3 発現 T 細胞（$CD4^+$及び $CD8^+$細胞）及び CD20 発現 B 細胞に同時に結合することができる。T 細胞に対する細胞傷害作用は、エプコリタマブの T 細胞上の CD3 及び B 細胞上の CD20 への結合に依存することが in vitro で示された。エプコリタマブは、FEA の不活性変異の導入により、抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity、ADCC）、抗体依存性細胞貪食（antibody-dependent cell-mediated phagocytosis、ADCP）などの Fcγ 受容体（Fc gamma receptor、FcγR）介在性エフェクター機能を誘導しないと考えられる。これらの変異によ

り、エプコリタマブは IgG の FcγR に結合できず、in vitro 機能アッセイで FcγR 依存的な CD3 架橋を誘導しない。さらに、不活性変異の導入は最小の C1q 結合及び補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity、CDC）誘導をもたらした。

エプコリタマブは、異なる B 細胞性悪性腫瘍に相当する複数の CD20 発現がん細胞株及び内因性ヒト B 細胞に対して、強力な in vitro 細胞毒性を誘導した。In vivo で、エプコリタマブはヒト免疫細胞を有するマウスの B 細胞性リンパ腫由来異種移植モデルで抗腫瘍活性を示した。

本毒性試験の概要文は、エプコリタマブの製造販売承認申請を裏付けるため、エプコリタマブの非臨床毒性試験データの要約を示すことを目的としている。さらに、これらの非臨床試験の概要表は M2.6.7 に示す。

エプコリタマブの非臨床毒性試験一覧を Table 2 に示す。

Table 2　エプコリタマブの毒性試験

Study Type	Study Title	Compliance	Test Facility (Study No.)
Single Dose	BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR and [redacted]: A Single-Dose Toxicity Study by Intravenous Injection in Cynomolgus Monkeys[a]	non-GLP	[redacted] ([redacted] 529668])
Repeat Dose	Dose Range Finding Study of BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Recovery Period	non-GLP	[redacted] ([redacted] 501775])
Repeat Dose	A 5-Week Toxicity Study of GEN3013 by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Bioavailability, Local Tolerance, and a 6-Week Recovery Period	GLP	[redacted] ([redacted] 503484])
Other Toxicity	Species Cross-reactivity Study in vitro to Determine Relevant Animal Species for Nonclinical Safety Studies	non-GLP	Genmab ([GMB3013-034])
Other Toxicity	ProStorm® Cytokine Release Assay	non-GLP	[redacted] ([32318, 32400])
Other Toxicity	Evaluation of cytokine release in whole blood induced by DuoBody-CD3xCD20 ex vivo	non-GLP	Genmab ([GMB3013-054])[b]
Other Toxicity	Evaluation of the Hemolytic Potential of GEN3013 in Human Whole Blood In Vitro and Plasma Compatibility Assessment	GLP	[redacted] ([redacted] 301352])
Other Toxicity	Development of an Immunohistochemical Staining Method for the Demonstration of Specific Positive Staining GEN3013 (DuoBody CD3×CD20) in Control Material and Assessment of Potential Cross-Reactivity in a Selected Panel of Human Tissues	non-GLP	[redacted] ([redacted] 8361457])
Other Toxicity	Assessment of the Potential Cross-Reactivity of GEN3013 (DuoBody CD3×CD20) with a Selected Panel of Human and Cynomolgus Monkey Tissues	GLP	[redacted] ([redacted] 8361454])

a [redacted] included in the single-dose study but is not reported here.
b This report summarizes calculations of EC_{20}, EC_{50}, and EC_{90} values as performed at Genmab for data from ProStorm Cytokine Storm Assays, Study 32318 and Study 32400.
CD = cluster of differentiation; FEAL = L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody mutations; FEAR = L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody mutations; GLP = good laboratory practice; IgG = immunoglobulin G

エプコリタマブの非臨床毒性試験プログラムは、ICH S9、S6(R1)ガイドライン及びその他の関連する ICH ガイドライン、並びに経済協力開発機構（Organization for Economic Co-operation and Development、OECD）の毒性試験ガイドライン及び GLP に準拠して、データ相互受け入れ制度（mutual acceptance of data、MAD）に加盟する国々で実施した。いくつかの非臨床安全性試験は探索的試験であることから、非 GLP 適用試験として実施した。これらの試験は科学的に妥当であり、GLP 試験の計画及び解釈に有用な情報を提供するために実施した。

エプコリタマブは、ヒト及びカニクイザルの CD3 及び CD20 に対して同程度に結合すること、in vitro でカニクイザルの細胞に薬理学的活性を示すこと、及びげっ歯類の CD3 及び CD20 と交差反応しないことから、エプコリタマブに関連する毒性評価に適する動物種としてカニクイザルを選択した。エプコリタマブは、カニクイザルでエプコリタマブの作用機序と一致するサイトカイン放出、末梢血 B 細胞の枯渇、及びリンパ系組織［脾臓、種々のリンパ節及び腸管関連リンパ組織（gut-associated lymphoid tissue、GALT）］でのリンパ球密度の減少といった薬理作用を in vivo で示すことが確認されている。

カニクイザル（*Macaca fascicularis*）を用いた毒性評価では、全身曝露量を増大させて毒性プロファイルを十分に明らかにするために、エプコリタマブを 1 mg/kg 以下の用量で週 1 回、反復静脈内投与した。臨床試験での皮下投与をサポートするため、GLP 適用試験でブリッジングによる毒性評価を行い、カニクイザルにエプコリタマブを皮下投与したときの安全性、生物学的利用率及び局所刺激性を評価した。

In vitro 安全性試験では、エプコリタマブの曝露はヒト全血アッセイでのサイトカイン放出と関連していた。エプコリタマブはヒト全血の溶血を引き起こさず、ヒト血液及び血漿と適合した。ヒト及びカニクイザルの組織の包括的パネルを用いた GLP 適用の組織交差反応性（tissue cross-reactivity、TCR）試験では、エプコリタマブの結合は様々な組織の単核細胞に限定され、動物種間で同程度であった。CD3 及び CD20 はそれぞれ T 細胞及び B 細胞に発現しているため、大部分の組織での血中リンパ球及び単核細胞の染色は予想された反応性と一致していた。

In vivo 安全性試験では、エプコリタマブ投与に伴い、用量に関連した有害な臨床徴候［嘔吐、活動性低下及び死亡（1 mg/kg 以上の用量のみ）］並びにサイトカイン放出が、主に初回投与後に観察され、可逆的な血液学的パラメーターの変化、末梢血中の可逆的 B 細胞枯渇、及び二次リンパ系組織での可逆的なリンパ球密度の減少が認められた。カニクイザルにエプコリタマブを皮下及び静脈内投与しても、エプコリタマブに関連した局所刺激性の所見は認められず、心血管系、呼吸系及び神経系に対する有害作用も確認されなかった。カニクイザルでの最高サイトカイン濃度は、同用量で静脈内投与と皮下投与を比較した場合、皮下投与の方がおおむね低かったが、末梢 B 細胞の枯渇は同程度であった。さらに、プライミングドーズを投与した後にエプコリタマブを静脈内投与すると、サイトカイン放出量が低下した。これらの結果は、皮下投与経路及び臨床試験でのプライミングドーズの使用の根拠を裏付けるものである。

エプコリタマブは免疫原性を有する可能性が高いことが示されており、カニクイザルを用いた静脈内及び皮下投与による毒性試験でエプコリタマブの全身曝露量が減少したことから、製造販売承認申請に際し、日米欧の各地域（PMDA、FDA、EMEA）で 13 週間反復投与毒性試験及び胚・胎児発生（embryo-fetal development、EFD）試験のいずれも不要であることが確認されている（FDA Type B End of Phase 1、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、Reference ID: [redacted]; EMEA Scientific Advice

Procedure No.: [redacted]；医薬品医療機器総合機構[redacted]相談、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日、#[redacted]）。製造販売承認申請をサポートするため、作用機序を考慮したエプコリタマブの胚・胎児発生に関するリスク評価のためのエビデンスの重み付けアプローチを実施した（[SUB-017262]）。エプコリタマブは母体から胎児に移行する可能性があり、その作用機序に基づき、胎児がエプコリタマブに曝露されると、子宮内曝露された乳児でB細胞性リンパ球減少症及び正常な免疫応答の変化など、有害ではあるが可逆的な発達転帰が生じる可能性がある。

以上のことから、エプコリタマブの全体的な安全性プロファイルは非臨床毒性試験で十分に解析されており、B細胞性悪性腫瘍に対するエプコリタマブの使用が裏付けられる。非臨床試験で特定された安全性リスクは、概してモニタリング可能であり、エプコリタマブの良好なリスクベネフィットバランスを示唆した。

2.　単回投与毒性

エプコリタマブのカニクイザルを用いた単回静脈内投与及び皮下投与による探索試験を実施し、潜在的な毒性のトキシコキネティクス（toxicokinetics、TK）、忍容性及び可逆性を評価した。本試験では、血漿中サイトカイン濃度、並びに末梢血 B 細胞数及び T 細胞数を含む特定の免疫パラメーターに対するエプコリタマブの免疫毒性も評価した。カニクイザルを用いた主要な反復投与毒性試験の用量選択の一助とした。

エプコリタマブの単回投与試験には、静脈内投与による探索毒性試験（[■■■ 529668]、2.1 項）、用量設定試験への単回投与群の追加（[■■■ 501775]、3.1 項）、並びに皮下投与による生物学的利用率の評価及び静脈内投与から皮下投与へのブリッジングを目的とした主要な反復投与毒性試験（[■■■ 503484]、3.2 項）が含まれる。

2.1　エプコリタマブのカニクイザルでの静脈内持続投与による単回投与毒性試験及び回復性試験（■■■ 529668）

単回投与探索毒性試験（[■■■ 529668]）は、雌カニクイザルに単回静脈内投与したときのエプコリタマブの毒性及び TK プロファイルを明らかにし、投与後 94 日までの所見の可逆性を評価するために実施した。本試験は非 GLP 適用試験であり、カニクイザルの成績に性差はないと考えられたことから、雌カニクイザルのみを使用した。本試験の結果に基づき、追加の用量設定反復投与試験での用量を決定した。

Table 3 に示すとおり、雌カニクイザル 8 例をエプコリタマブ投与群に割り付けた。各投与群は雌 2 例からなり、1 例は投与後 28 日（Day 29）に安楽死させ、他の 1 例は B 細胞数が適切なベースライン値又は試験前値に回復した Day 95 に安楽死させた。

Table 3　**エプコリタマブの雌カニクイザルでの単回静脈内持続投与毒性試験の試験デザイン**

Group	Epcoritamab (mg/kg)	Dose Volume (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Day of Dose Administration	Scheduled Day of Necropsy
1	0.01	10	0.001	1	29/95
2	0.1	10	0.01	1	29/95
3	1	10	0.1	1	29/95
4	10	10	1	8/10	36/95

n=2 females/group whereof 1 animal was euthanized 28 days after dose (Day 29), and one animal was euthanized 94 days (group 1-3) or 84 days after dose (group 4) on study Day 95.

すべての動物にエプコリタマブを 10 mL/kg の投与容量で 30 分かけて単回静脈内持続投与した。静脈内投与用の溶媒としてリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline、PBS）を使用した。本試験で評価したパラメーター及び評価項目は、一般状態、体重、TK、抗薬物抗体（anti-drug antibody、ADA）、臨床病理学的パラメーター（血液学的検査、凝固系検査、血液生化学的検査）、補体因子、フローサイトメトリーによるイムノフェノタイピング（末梢血、リンパ節及び骨髄）、サイトカイン、肉眼剖検所見、器官重量及び特定の病理組織学的所見とした。

体重、凝固系検査、血液生化学的検査及び器官重量にいずれもエプコリタマブに関連した影響は認められなかった。肉眼剖検所見も観察されなかった。

エプコリタマブを静脈内投与した後の血漿中濃度-時間プロファイルより、標的介在性クリアランスが示された。投与量補正した $AUC_{0\text{-}7d}$（$AUC_{0\text{-}7d}$ normalized for the dose received、$nAUC_{0\text{-}7d}$）に基づき、エプコリタマブの曝露量は用量増加に伴い用量比を上回って増加した。IgG アイソタイプ［G1m（a）サブタイプ］の ADA 反応がすべての動物に観察された。IgM アイソタイプの ADA 反応は、0.01 又は 0.1 mg/kg 群のみに認められた。

エプコリタマブの投与に伴い、0.1、1 又は 10 mg/kg 群の 4 例で投与後約 15 分から 2 時間に白色、褐色又は黄色の嘔吐が観察された。加えて、10 mg/kg 群の 1 例は投与後約 1.5 時間にケージ内の他の動物と接触せず、静かに円背位を示し、機敏な動作と良好な反応性がみられたものの、投与後 6 時間まで通常よりも静穏であった。

サイトカイン解析では、腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor、TNF）α、インターロイキン（interleukin、IL）-1β 及び IL-4 の血漿中濃度のごく軽度な上昇、並びにインターフェロン（interferon、IFN）γ、IL-6 及び IL-8 の用量依存的な中等度の上昇を示した。すべての用量でサイトカイン放出が認められたが、一過性であり、概して投与後 6 時間以内に最高濃度に達し、投与終了後 24 時間以内にベースライン又はその付近の濃度に回復した。IL-2、IL-10、IL-12-p70 及び IL-15 に変化は認められなかった。

補体パラメーターの変化は様々であった。第 B 因子の Bb フラグメント（Bb）濃度は、エプコリタマブを投与したすべての動物で投与後 4 時間まで高値を示した。1 又は 10 mg/kg のエプコリタマブを投与したすべての動物で、投与後 4 時間まで補体 C3a（C3a）及び終末補体複合体（SC5b-9）濃度が高かった。補体 4（C4）及び総補体（CH50）濃度は、エプコリタマブを投与したすべての動物で投与後 4 時間まで低かった。補体-4a（C4a）、4d（C4d）、及び 3c（C3c）の濃度に対するエプコリタマブの明らかな影響は認められなかった。

最大 1 mg/kg の用量でエプコリタマブを投与した動物では、総白血球数及び好中球数の顕著な高値が投与直後から投与後 4 時間まで認められた。全用量群の動物で、リンパ球数、単球数、好酸球数及び好塩基球数の中等度から顕著な減少が投与直後、投与後 2 時間又は投与後 4 時間まで観察された。Day 8 までに回復性を示すエビデンスが認められた。全例で投与後 7 日に網赤血球数の増加が認められた。この変化は一部の動物でみられたヘモグロビン濃度、赤血球数及びヘマトクリットの低値と関連しており、採血手法に続発したものと考えられた。

CD20 とは異なる表面抗原、例えば分化抗原群（CD）19^+細胞を用いた B 細胞ポピュレーションのイムノフェノタイピング（被験物質の干渉を回避するため）により、エプコリタマブは Day 2 のすべての用量レベルで総 B 細胞数及び一部の B 細胞サブポピュレーションの減少と関連することが示された。減少の程度及び持続期間は用量依存的であった。0.01 及び 0.1 mg/kg の用量では、総 B 細胞（$CD19^+$）の減少は比較的少なく、一部動物では Day 4～8 までにベースライン値に回復した。エプコリタマブの 1 及び 10 mg/kg の用量では、末梢血総 B 細胞（$CD19^+$）がほぼ完全に枯渇し、それぞれ Day 50 又は Day 78 までにベースライン値又はその付近まで回復した。リンパ節では総 B 細胞（$CD19^+$）も減少し、1 及び 10 mg/kg で顕著な影響が認められたが、概して投与後 94 日までにベースライン値又はそれに近い値に回復した。

エプコリタマブは、末梢血中の総 T 細胞ポピュレーション（$CD4^+$及び $CD8^+$細胞）並びに一部の $CD4^+$及び $CD8^+$サブポピュレーションでも、初期に用量依存的な減少を引き起こした。エプコリタマブを高用量で投与した場合、投与翌日の末梢血中の T 細胞（$CD4^+$及び $CD8^+$細胞）数が

最も少なかった。Day 2 の 0.01 mg/kg 群では、減少は軽度であったが、10 mg/kg 群では血液中からほぼ完全に消失した。すべての用量レベルで、最初に減少するが、Day 4 までに T 細胞（$CD4^+$及び$CD8^+$細胞）の回復が認められ、一部の活性化プログラム細胞死タンパク質 1（Programmed cell Death 1、PD-1）発現 T 細胞ポピュレーション（$CD4^+PD\text{-}1^+$、$CD8^+PD\text{-}1^+$）では、Day 8 から Day 29 までベースライン値を上回る明らかな用量依存的な増加が認められた。リンパ節では、総 T 細胞（$CD4^+$及び$CD8^+$細胞）のレベル（総リンパ球の割合として表示）に明らかな変化は認められなかったが、0.1 mg/kg 以上の用量で Day 7 及び 16 に$CD4^+PD\text{-}1^+$あるいは$CD8^+PD\text{-}1^+$T 細胞サブポピュレーションの用量依存的な増加が認められた。リンパ節でのこれらの$CD4^+PD\text{-}1^+$あるいは$CD8^+PD\text{-}1^+$T 細胞の増加は、Day 28 までにベースライン値まで回復した。

病理組織学的検査では、Day 29 及び 36 にそれぞれエプコリタマブの 1 又は 10 mg/kg 群の動物の下顎リンパ節、腸間膜リンパ節及び脾臓で、胚中心の中等度から顕著なリンパ球密度減少が認められた。これらの用量では Day 95 に変化はみられなかった。

以上のことから、カニクイザルにエプコリタマブを最大 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与した結果、一般状態の変化（0.1 mg/kg 以上で嘔吐、10 mg/kg 群の 1 例で活動性低下）、サイトカイン放出、並びに補体パラメーター、血液学的検査、並びに末梢血及びリンパ節中の T 細胞あるいは B 細胞ポピュレーションの変化が観察された。病理組織学的検査では、エプコリタマブの 1 及び 10 mg/kg 群で投与後 28 日にリンパ組織の胚中心のリンパ球密度減少が認められた。これらの変化は、予想されたエプコリタマブの薬理活性と一致していた。エプコリタマブを 10 mg/kg の用量で投与した 2 例中 1 例で有害な臨床徴候が観察され、2 例とも顕著なサイトカイン反応が認められたことから、10 mg/kg の用量はこの動物種への反復投与には適さないと考えられた。

2.2　プライミングドーズを伴う単回静脈内投与

エプコリタマブの TK 及び毒性は、Day 1 にプライミングドーズとして 0.01 mg/kg を静脈内投与した後、Day 2 に目標用量として 1 mg/kg を単回投与して評価した。TK パラメーターは 1 mg/kg の用量でのみ算出した。3.1 項に記載したとおり、この評価は用量設定試験（[■■■501775]）とは別の用量群として含めた。

2.3　単回皮下投与

3.1 項に記載したとおり、用量設定試験（[■■■501775]）では、カニクイザルに単回皮下投与したときのエプコリタマブの TK 及び毒性を別々の群として評価した。

3.　反復投与毒性

3.1　エプコリタマブ：カニクイザルでの静脈内持続投与又は皮下投与による用量設定試験及び回復性試験（[redacted]501775）

本試験は、雌カニクイザルにエプコリタマブを週 1 回、4 週間反復静脈内持続投与（30 分間）又は単回皮下投与したときの毒性及び TK を検討し、毒性所見の可逆性を評価するために実施した（[[redacted]501775]）。さらに、プライミングドーズとしてエプコリタマブを Day 1 に静脈内投与した後、Day 2 に単回投与した。本試験は非 GLP 適用試験であり、カニクイザルの成績に性差はないと考えられたことから、雌カニクイザルのみを使用した。この試験結果より、主要な GLP 適用反復投与毒性試験での用量を決定した。静脈内投与用の溶媒として、PBS、皮下投与用の溶媒として 150 mmol/L ソルビトールを含む pH 5.5 の 30 mmol/L 酢酸緩衝液をそれぞれ使用した。

雌カニクイザル 18 例（各群 2 例）を試験に割り付けた。投与開始時の動物の年齢は約 3～4.5 歳齢であった。以下の試験デザインに従い各群に投与した。剖検前に B 細胞が回復するよう、動物は指示どおりに飼育した。試験デザインの要約を Table 4 に示す。

Table 4　雌カニクイザルに静脈内及び皮下投与したときの用量設定試験の試験デザイン

Group	Epcoritamab (mg/kg)	Dose Volume (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Day of Dose Administration	Scheduled Day of Necropsy
Repeat-Dose IV					
1	0.01	10	0.001	1, 8, 15, 22	106/106
2	0.1	10	0.01	1, 8, 15, 22	106/106
3	1	10	0.1	1, 8, 15, 22	106/148
Single-Dose IV					
4	0.01/1[a]	10	0.001/0.01	1 (priming)/2 (target)	29/29
Single-Dose SC					
5	1	1	1	1	135[b]/134
6	10	1	10	1	134/134
7	20	1	20	36	148/92[b]
8	0.01	1	0.01	57	141/141
9	0.1	1	0.1	57	141/141

IV = intravenous; SC = subcutaneous. n=2 females/group
a　Priming Dose (Day 1) + Target Dose (Day 2)
b　Unscheduled necropsy; Day presented reflects actual study day number.

本試験では、生死確認、一般状態、体重、血圧、体温、臨床病理学的パラメーター（血液学的検査及び血液生化学的検査）、フローサイトメトリーによる末梢血、リンパ節及び骨髄のイムノフェノタイピング、サイトカイン、TK パラメーター、ADA、器官重量、肉眼剖検所見及び病理組織学的所見を評価した。Table 4 に示した予定日に剖検した。

皮下投与後に 2 例が試験期間中に死亡した。20 mg/kg 群の 1 例（Day 36 に投与）は、Day 92 の予定された血液学的検査で重度の貧血（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリットの顕著な低値、並びに赤血球分布幅及び網赤血球数の高値）が認められたため、投与後 57 日に早期に安楽死させた（Day 92）。病理組織学的検査では、大腿骨髄の造血亢進所見は貧血の臨床所見と関連していた。この動物でのその他の病理組織学的所見として、脾臓白脾髄（濾胞及び辺縁帯）のリンパ球密度の減少及び GALT の減少が認められた。副腎皮質肥大、胸骨骨髄及び大腿骨髄のリンパ球浸潤、並びに肝臓で門脈周囲単核細胞浸潤が認められた。脾臓及び GALT でのリンパ球密度の減少は、予想されたエプコリタマブの薬理作用と一致していた。20 mg/kg を皮下投与したときの重度の貧血は、エプコリタマブとの関連性は不明と判断された。10 mg/kg 以下の用量で単回皮下投与、又は 1 mg/kg 以下の用量で週 1 回反復静脈内投与した動物での赤血球パラメーターの変化は可逆的であり、病理組織学的所見を伴わなかったことから、全体として毒性学的意義はないと考えられた。

別の早期死亡動物として、Day 1 に 1 mg/kg の用量でエプコリタマブの皮下投与を受け、全身状態不良により Day 135 に屠殺された動物が 1 例認められた。この動物は Day 66 から時折、脱水症状を発現し、Day 69 以降も持続する液状便、Day 71 に体重減少（Day 1 と比較して 0.6 kg 減）が認められた。これらの所見は、感染が原因である可能性を示唆しており、獣医学的処置（補液療法及び抗生物質投与）により、この動物の一般状態及び体重増加量に改善が認められた。Day 135 では、この動物の B 細胞数が依然として低値であり、回復の徴候が認められなかったことから、当該動物を安楽死させた。この動物の病理組織学的所見として、胸腺髄質及び白脾

髄の濾胞でのリンパ球密度の減少が認められた。これらの病理組織学的所見は、エプコリタマブで予想される薬理作用と一致していた。

Day 1 に、静脈内投与の 0.01、0.1 及び 1 mg/kg 群の動物で、0.01 mg/kg（プライミングドーズ）群の 1 例並びに皮下投与の 1 又は 10 mg/kg 群の 1 例で、泡沫状の白色嘔吐が観察された。20 mg/kg（皮下投与）群の 1 例で褐色液状嘔吐物が、0.1 mg/kg（静脈内投与）群の 1 例で Day 8 に褐色泡沫状嘔吐物が認められた。静脈内投与の各群及び皮下投与の 1 又は 10 mg/kg 群の動物で、投与後に黄色の粘液物質が認められた。

1 mg/kg（静脈内投与）群の 1 例で Day 15 に体重減少（0.4 kg 減）が認められ、Day 1 の値と比較された。この動物の体重は改善し、Day 50 に記録した体重は Day 1 と同程度であった。1 mg/kg（皮下投与）群の 1 例で一過性の体重減少が認められた。

エプコリタマブに起因する体温又は血圧の変化は認められなかった。

0.01 mg/kg 以上を静脈内投与した動物では、初回投与後 2 時間に総白血球数あるいは好中球数の増加が観察された。同様に、Day 8、15 及び 22 の投与後 2 時間にもこれらの検査値の増加が認められた。ほとんどの場合、好中球数は次回投与前に投与前値に回復した。0.01 mg/kg 以上の群（第 1 群～第 4 群）でリンパ球数及び単球数の低値が初回投与後 2 時間及び Day 2 に認められた。同様に、Day 8、15 及び 22 でも、投与後 2 時間にリンパ球数の低値が認められた（第 1～3 群）。Day 8、15 及び 22 の投与前のリンパ球数は投与前値と同程度と考えられた。

1 又は 10 mg/kg 群の皮下投与後 2 時間に好中球数の増加が観察され、20 mg/kg 群の Day 2 に好中球数の増加が認められた。0.01 及び 0.1 mg/kg 群では投与後 2 時間に、1 mg/kg 群の 1 例では投与後 2 時間に総白血球数の増加が観察された。リンパ球数及び単球数の減少が、皮下投与群の全例で投与後 2 時間及び Day 2 に認められた。Day 4 以降より回復を示すエビデンスが認められた。

投与に起因する明らかな血液生化学的変化は認められなかった。

イムノフェノタイピングの結果、エプコリタマブは全用量で末梢血の T 細胞及び B 細胞ポピュレーションに影響を及ぼし、T 細胞数は投与後 2 時間以内に一過性に減少し、Day 8 又はそれ以降の投与までにベースライン値又はそれに近い値に回復することが示された。B 細胞ポピュレーションの減少は初回投与後 2 時間以内にも生じたが、ベースライン値への回復は時間及び用量に関連しており、一部のポピュレーションでは Day 148 まで回復しなかった。リンパ節生検でも B 細胞ポピュレーションの枯渇が観察された。骨髄のイムノフェノタイピングでは、投与経路間で細胞ポピュレーションに僅かな差が認められ、特に前駆 B 細胞ポピュレーションでは静脈内投与群と比較して皮下投与群でこれらの細胞数が減少したと考えられた。0.01/1 mg/kg 群（第 4 群）では前駆細胞数及び未成熟な B 細胞ポピュレーションの減少が観察された。

サイトカイン解析では、TNFα 及び IL-15 の血漿中濃度が上昇し、静脈内又は皮下投与後の IL-2、IL-6、IL-8、IL-10 及び IFNγ 濃度は用量依存的に著しく上昇した。すべての用量でサイトカイン（1 種類以上のサイトカイン）の放出が観察され、主に初回投与後に認められたが、投与後 24 時間以内にベースライン値又はその付近まで回復した。サイトカインの最高濃度は、同用量で静脈内投与と皮下投与を比較した場合、皮下投与の方がおおむね低かった。これは特に単球走化性タンパク質-1（monocyte chemotactic protein-1、MCP-1）で顕著であったが、IFNγ では顕著ではなかった。また、Day 1 にプライミングドーズ（0.01 mg/kg）を静脈内投与した後、Day 2

に 1 mg/kg を投与したとき、サイトカイン放出量は全体的に大幅に減少した。IL-1β、IL-4 又は IL-12-p40 濃度には、明らかな用量相関性又は時間に関連する変化は認められなかった。一部の動物では投与前のサイトカイン濃度が広範囲に及んだこと、及び本試験の動物数が限定されていたことから、結果の一般的な解釈のみを示す。

TK 試験では、静脈内投与後のエプコリタマブの血漿中濃度-時間プロファイルから、標的介在性 CL が示された。エプコリタマブの曝露量は、高用量の 1 mg/kg までの用量では用量比を上回り増加した。1 mg/kg では、週 1 回反復投与後に曝露量の増加が認められたことから、エプコリタマブの蓄積が示唆された。反復投与後の血漿中濃度-時間プロファイルは、1 mg/kg 群の 1 例を除き、ADA 反応の影響を受けた。この動物では、反復投与により投与後 7 日までの AUC（area under the concentration-time curve from time zero to time t=7 days、$AUC_{0\text{-}7d}$）が増加したことから、エプコリタマブの蓄積性が示された。皮下投与の場合、投与後 0.5～7 日に最高濃度（the maximum observed concentration observed after dosing、C_{max}）に到達した。エプコリタマブの曝露量は、1 mg/kg までの用量では用量比を上回る増加が認められ、1 mg/kg を超える用量では用量比例的に増加した。1 mg/kg を皮下投与したときの絶対的生物学的利用率は 100%であった。

計画剖検時に、骨髄（軽微又は軽度の造血亢進）、脾臓（濾胞及び辺縁帯の中等度又は顕著なリンパ球密度減少）及び腎臓（軽度の炎症）の所見が、0.01/1 mg/kg の静脈内投与後（第 4 群）及び 1 mg/kg の静脈内投与後（第 3 群）の骨髄（軽度の造血亢進）に観察された。骨髄所見（軽微又は軽度のリンパ球浸潤）がすべての皮下投与群で認められた。被験物質に起因する器官重量及び剖検所見は観察されなかった。

以上のことから、カニクイザルにエプコリタマブを 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与（プライミングドーズ：0.01 mg/kg）又は最高 1 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与したときの忍容性はおおむね良好であり、血液学的変化及びリンパ球サブポピュレーションの変化を伴っていた。すべての用量で投与後に嘔吐が認められ、ときにサイトカイン濃度の上昇と関連していた。Day 1 にプライミングドーズ（0.01 mg/kg）を静脈内投与した後、Day 2 に 1 mg/kg を投与したとき、サイトカイン放出量は全体的に大幅に減少した。0.01/1 mg/kg 又は 1 mg/kg 群の大腿骨あるいは胸骨骨髄に軽微又は軽度の造血亢進が認められた。また、0.01/1 mg/kg では、脾臓の濾胞及び辺縁帯のリンパ球密度の中等度又は顕著な減少、及び腎臓の軽度の炎症が観察された。

エプコリタマブを最高 20 mg/kg の用量で単回皮下投与した場合も投与後に嘔吐が認められ、サイトカイン濃度の上昇と関連する場合があると結論付けられた。大部分のサイトカイン最高濃度は、同用量で静脈内投与と皮下投与を比較した場合、皮下投与の方がおおむね低かった。血液学的変化及びリンパ球サブポピュレーションの変化がすべての用量で認められた。胸骨あるいは大腿骨骨髄での軽微又は軽度のリンパ球浸潤が、すべての用量で認められた。皮下投与群での 2 例の早期死亡は、それぞれ重度の貧血及び感染の疑いに起因し、エプコリタマブとの関連性は不明であった。

これらの所見に基づき、この動物種に反復投与する場合の高用量として、静脈内投与による 1 mg/kg 及び皮下投与による 10 mg/kg が適切であると考えられた。

3.2　エプコリタマブ:カニクイザルでの 5 週間静脈内持続投与及び皮下投与毒性試験並びに 6 週間回復性試験（生物学的利用率、局所刺激性評価を含む）（[redacted] 503484）

主要な GLP 適用毒性試験（[[redacted] 503484]）は、カニクイザルにエプコリタマブを単回又は週 1 回（Q1W × 5）静脈内持続投与（30 分間）若しくは月 1 回皮下投与（Day 1 及び Day 29）したときの毒性及び TK の評価を目的として実施した。高用量（1 mg/kg）を反復投与し、6 週間の回復期間を設けて、観察された変化の可逆性を評価した。単回静脈内投与は、エプコリタマブの皮下投与による相対的生物学的利用率の測定にも用いた。その他の目的として、皮下投与時の局所刺激性及び安全性薬理の評価（心電図検査及び詳細な一般状態観察）を行った。単回静脈内投与の場合は Day 36、反復投与の場合は 1 週間後（Day 36）、2 回目の皮下投与の場合は 4 日後（Day 33）に主要試験の動物を安楽死させた。回復性試験の動物は Day 72 に安楽死させた。静脈内投与用の溶媒として、0.9%生理食塩水、皮下投与用の溶媒としては 150 mmol/L ソルビトールを含む pH 5.5 の 30 mmol/L 酢酸緩衝液をそれぞれ使用した。

カニクイザル 62 例を試験に割り付けた。投与開始時の動物年齢は約 4～6 歳齢であった。各群には、Table 5 に要約した試験デザインに従って投与した。

Table 5　**雌雄カニクイザルでの主要な GLP 適用反復投与毒性試験の試験デザイン**

Group No.	Test Item	Route (frequency)	Dose Level (mg/kg)	Dose Volume (mL/kg)	Dose Concen-tration (mg/mL)	Number of Animals			
						Main Study		Recovery	
						Males	Females	Males	Females
1	Control[a]	IV (Q1W × 5)	0	10	0	3	3	2	2
2	Epco-ritamab	IV (Q1W × 5)	0.01	10	0.001	3	3	-	-
3		IV (Q1W × 5)	0.1	10	0.01	3	3	-	-
4		IV (Q1W × 5)	1.0	10	0.1	3	3	2	2
5		IV (SD)	0.1	10	0.01	3	3	-	-
6		IV (SD)	1.0	10	0.1	3	3	-	-
7		SC (2 × SD)	0 + 0.1	0.2	0 + 0.5	3	3	-	-
8		SC (2 × SD)	0 + 1.0	0.2	0 + 5	3	3	-	-
9		SC (2 × SD)	0 + 10	0.2	0 + 50	3	3	-	-

IV (Q1W × 5) = Once a week intravenous (IV) dose for five occasions (Days 1, 8, 15, 22, and 29); termination: Day 36 (main study); termination: Day 72 (recovery)
IV (SD) = Single intravenous (IV) dose (Day 1); termination: Day 36
SC (2 × SD) = Single subcutaneous (SC) dose with epcoritamab and its vehicle on Days 1 and 29, separate injection sites in same animal; termination: Day 33. In this study, epcoritamab was administered SC on Days 1 and 29; toxicokinetics were evaluated on Day 1 (single dose); local tolerance was evaluated for the Days 1 and 29 SC injection sites
a　Control Item was 0.9% saline

本試験では、一般状態、体重、眼科学的所見、心電図、臨床病理学的パラメーター（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）、TK パラメーター、ADA、サイトカイン、フローサイトメトリー（全血、リンパ節、骨髄）、肉眼剖検所見、器官重量、並びに病理組織学的検査所見を評価した。

本試験は、ICH ガイドラインに従って行われ、エプコリタマブの毒性を特徴づける適切なデザインと範囲であり、GLP に準拠して実施された。エプコリタマブ濃度の 0.001 mg/mL（低濃度の

反復静脈内投与液）について、バリデートされた紫外分光光度法（A280 nm）を用いた投与液分析が実施不可能であったことから、本試験の投与液分析については GLP 適用外とした。その結果、エプコリタマブを 0.01 mg/kg の用量で反復静脈内投与した動物（第 2 群）については、濃度分析結果が得られていない。これらの結果が得られなかったことは、試験の品質及び結論に悪影響を及ぼさなかったと判断された。調製記録は投与液が正しく調製されたことを示した。この用量での動物はエプコリタマブに全身曝露されたが、曝露量を制限する ADA 陽性反応を示した。無毒性量（no observed adverse effect level、NOAEL）は 0.1 mg/kg（第 3 群）と考えられたことから、低用量での濃度が確認されなかったことは試験の結論に影響を及ぼさないと考えられた。A280 nm の結果から、静脈内投与では濃度 0.01 及び 0.1 mg/mL、皮下投与では濃度 0.5、5 及び 50 mg/mL の投与液が概してすべて判定基準内であることが示された。

週 1 回で 5 回静脈内投与の初回後、エプコリタマブの全身曝露量は、雌雄共に用量範囲全体で用量比以上に増加した。反復静脈内投与後、Day 15 及び 29 に 0.01 又は 0.1 mg/kg を投与した動物の大部分で ADA 反応が認められ（8.2 項）、定量可能なエプコリタマブ濃度は限定的であった。最高用量群の雌雄でのエプコリタマブの全身曝露量は、Day 1 と比較して Day 15 で増加し、Day 29 までに更に増加したことから、1 mg/kg 群ではエプコリタマブのわずかな蓄積が示唆された。

単回静脈内投与後（第 5 群及び第 6 群）、エプコリタマブの全身曝露量は、0.1～1 mg/kg の範囲で概して用量比以上に増加した。静脈内投与後の最高濃度到達時間（time after dosing at which the maximum observed concentration is observed、t_{max}）の中央値は一貫して 0.021 日間であった（0.5 時間、持続投与終了時）。クリアランス、見かけの分布容積（apparent volume of distribution、V_D）及び定常状態での見かけの分布容積（apparent volume of distribution at steady state、V_{ss}）は用量の増加に伴い減少する傾向が認められた。

単回皮下投与後のエプコリタマブの全身曝露量は、雌雄共に 0.1 mg/kg から 10 mg/kg の範囲で用量比以上に増加した。中央値 t_{max} は雄では一貫して 3 日であり、雌では 7 日までばらつきがみられる傾向があった。1 mg/kg を皮下投与したとき、エプコリタマブの生物学的利用率は雄及び雌でそれぞれ約 85%及び 49%であった。1 mg/kg 群の雄及び雌での消失半減期の平均値は、それぞれ静脈内投与後 4.1 日及び 5.2 日、皮下投与後 2.6 日及び 2.3 日であった。

静脈内投与後の全身曝露量に一貫した性差は認められなかった。エプコリタマブの曝露量は、0.1 mg/kg 群の雄の方が雌よりも高く、皮下投与後の両高用量群で同程度であった。エプコリタマブの TK の要約を Table 6 に示す。

Table 6　エプコリタマブの TK パラメーターの概要

Route	Day	Dose (mg/kg)	Parameter					
			C_{max}[a] (μg/mL)		$AUC_{0\text{-}t}$[a] (μg·day/mL)		$AUC_{0\text{-}7d}$[a] (μg·day/mL)	
			Males	Females	Males	Females	Males	Females
Intravenous (infusion)	1	0.01	0.102	0.0957	0.00671	0.00596	0.00683	0.00608
		0.1	1.61	1.77	0.234	0.299	0.234	0.299
		1	24.0	24.6	23.9	27.0	23.9	27.0
	15	0.01[b]	-	-	-	-	-	-
		0.1[b]	-	-	-	-	-	-
		1	23.6	27.0	44.2	49.2	44.2	49.2
	29	0.01[b]	-	-	-	-	-	-
		0.1[b]	-	-	-	-	-	-
		1	37.2	28.5	100	82.5	84.2	71.3
Single Intravenous (infusion)	1	0.1	1.61	1.30	0.550	0.177	-	-
		1	21.6	28.4	25.5	26.5	-	-
Single Subcutaneous	1	0.1	0.244	0.111	1.54	0.671	-	-
		1	2.10	1.67	21.6	17.1	-	-
		10	35.9	35.1	389	385	-	-

$AUC_{0\text{-}7d}$ = area under the concentration-time curve from time zero to time t=7 days;
$AUC_{0\,t}$ = area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration;
C_{max} = the maximum observed concentration observed after dosing
a　Units of amount of drug were adjusted to μg from ng in study report. Values were rounded to three significant digits.
b　All animals dosed at 0.01 and 0.1 mg/kg on Days 15 and 29 exhibited a positive anti-drug antibodies (ADA) response, therefore no toxicokinetic (TK) parameters were reported.

試験期間中に 1 例が死亡した。1 mg/kg 静脈内投与群の雌 1 例は、単回投与後に投与に関連する有害反応（活動性低下、円背位、衰弱及び脱力）が発現したため、投与後約 12.75 時間に安楽死させた。この動物の死亡原因は病理組織学的検査では特定できなかったが、初回投与後のサイトカイン増加に関連すると考えられた。

単回静脈内投与後、0.1 又は 1 mg/kg 群の雌雄で投与後約 4～6 時間に活動性低下及び円背位が認められ、雌では投与後約 12 時間にも認められた。0.1 又は 1 mg/kg 群の雄では、投与直後又は投与後約 2 時間までに、白色の泡沫状又は黄色の液状嘔吐が散発的に認められた。同様に、1 mg/kg 群の雌で、投与直後又は投与後約 2 時間までに黄色又は白色の泡沫状又は黄色の液状嘔吐が観察された。動物は単回投与後 24 時間には正常と考えられた。

反復静脈内投与では、1 mg/kg 群の雄 1 例で Day 8 の投与後約 1～2 時間に円背位が観察された。Day 8 又はその他の投与時に、投与に起因すると考えられるその他の徴候はみられなかった。

単回皮下投与後、すべての用量で雌雄に活動性低下及び円背位が投与後約 4～6 時間に認められ、投与後約 12 時間も持続していた。0.1 mg/kg 群の雄で白色の泡沫状の嘔吐が、1 又は 10 mg/kg 群の雌雄で白色又は透明の液状の嘔吐が投与後約 4 時間に認められた。全用量群の雄及び 0.1 mg/kg 群又は 1 mg/kg 群の雌で、投与後約 4 時間から 12 時間の間に、体表面に全身性の皮膚発赤が単発的に認められた。0.1 又は 10 mg/kg 群の雄及び 1 又は 10 mg/kg 群の雌で、投与後 6 又は 12 時間に軽度の協調運動障害が認められた。全体として、これらの臨床徴候（僅かな協調運動障害を含む）は、タイミングと発現時期に基づきエプコリタマブ投与後のサイトカイン濃度上昇に関連する可能性があると考えられ、投与後に認められた他の臨床徴候（活動性低下及

び円背位）と一致する。協調運動障害の一般状態の変化は一過性であり、反復投与後に再発することはなく、追加の獣医学的検査を必要とせず、関連する病理組織学的所見を伴わず、試験全体の NOAEL の決定に影響を及ぼさなかった。最終皮下投与後の Day 29 及び週 1 回静脈内投与後に同様の徴候は観察されなかった。そのため、中枢神経系への直接作用を示唆する一般状態の変化は認められなかった。

エプコリタマブ投与後の詳細な一般状態観察では、気道の変化（例：鼻汁、努力呼吸／気管支痙攣）は認められなかった。

体重は投与による影響を受けなかった。

第 4 週にはエプコリタマブに関連する眼科学的所見は認められず、Day 8 及び Day 22（第 1 群～第 4 群：反復静脈内投与）又は Day 1（第 5 群～第 9 群、単回静脈内又は皮下投与）には心電図変化（心拍数及び RR、PR、QRS、QT 間隔）は認められなかった。

反復静脈内投与後、1 mg/kg 群の雄で Day 8 に総白血球数及びリンパ球数の増加（対照群の約 2.0 倍及び 2.2 倍）が認められた。同様に、0.1 又は 1 mg/kg 群の雄では、Day 15 に測定値の増加（対照群の約 1.9 倍又は 2.3 倍）がみられ、Day 22 にも程度は低いものの（対照群の約 1.5 倍又は 1.9 倍）認められた。1 mg/kg 群の雄で単球数、好塩基球数及び好酸球数の高値（対照群の約 2.0～14.6 倍）が Day 8 及び Day 15 に、1 mg/kg 群の雌で単球数の高値（対照群の 1.8 倍）が Day 15 に認められた。雄の細胞数は、Day 29 又は回復期間中の対照群又は投与前値と同程度と考えられた。総白血球数及びリンパ球数の減少が 1 mg/kg 群の雌で Day 29 及び Day 36 に認められた（対照群の約 0.51～0.70 倍）。その後、数値は対照群及び投与前値と同程度であった。1 mg/kg 群の雄では Day 8 及び Day 15 に軽微なヘモグロビン濃度の低下及びヘマトクリットの減少（対照群の約 0.86 倍～0.89 倍）が認められ、0.1 mg/kg 群の雄では Day 15 に同様の変化（対照群の約 0.87 倍又は 0.89 倍）が認められた。

単回静脈内投与では、0.1 又は 1 mg/kg 群の雄で Day 8 に総白血球数、リンパ球数、単球数、好酸球数及び好塩基球数の高値（投与前値の約 1.4 倍～5.0 倍）が認められた。同様に、Day 15 及び Day 22 に 0.1 又は 1 mg/kg 群の雌雄で総白血球数及びリンパ球数の高値（投与前値の約 1.4～10.3 倍）、Day 15 に 0.1 又は 1 mg/kg 群の雌雄で好酸球数の高値（投与前値の約 3.5～10.3 倍）が認められた。Day 29 及び Day 36 の測定値は投与前値と同程度であった。1 mg/kg 群の雄で、Day 8 及び Day 15 のヘモグロビン濃度及びヘマトクリットの僅かな低下が認められた（投与前値の約 0.88～0.92 倍）。

皮下投与後、Day 8 にすべての投与群の雄及び 1 又は 10 mg/kg 群の雌で総白血球数の高値（投与前値の約 1.3～2.5 倍）が認められた。Day 15 にすべての投与群の雌雄で総白血球数及びリンパ球数の高値（投与前値の約 1.7～2.4 倍）が、Day 22 にすべての投与群の雄で総白血球数及びリンパ球数の高値（投与前値の約 1.4～1.8 倍）が認められた。好酸球数及び単球数は、雄のすべての投与群で Day 15 及び Day 22 に、雌のすべての投与群で Day 8 及び Day 15 に増加した（投与前値の約 1.3～12.8 倍）。Day 29 及び Day 33 の測定値は投与前値と同程度であった。Day 8、Day 15 及び Day 22 に、すべての投与群の雌雄でヘモグロビン濃度及びヘマトクリットの軽微な低値（投与前値の約 0.8～0.94 倍）が認められた。

第 4 週又は第 8 週（回復性試験）では、明らかな血液生化学的変化は認められず、尿組成はエプコリタマブ投与の影響を受けなかった。

末梢血、骨髄あるいはリンパ節のフローサイトメトリーより、エプコリタマブは投与直後にすべての細胞型に影響を及ぼすことが示されたが、総 T 細胞ポピュレーション及び T 細胞サブポピュレーションの回復は B 細胞と比較して速やかであり、B 細胞の回復は概してすべての投与群で緩徐であった。低用量群では、後の時点で一部動物に僅かな回復が認められた。回復期間中に更に検査した動物では、骨髄中の前駆 B 細胞及び未成熟 B 細胞の増加が観察された。これは、B 細胞ポピュレーションが回復し始めていることを示した。

サイトカイン濃度は初回投与後に概して顕著に上昇した。反復投与後に認められた増加はそれほど顕著ではなかった。大部分のサイトカイン最高濃度は、同用量で静脈内投与と皮下投与を比較した場合、皮下投与の方がおおむね低かった。概して、大部分のサイトカインに対する初期反応が最も高かったのは、1 mg/kg を静脈内投与した動物（第 6 群）及び 10 mg/kg を皮下投与した動物（第 9 群）であった。

エプコリタマブに関連する肉眼所見又は器官重量の変化は認められなかった。

病理組織学的検査では、エプコリタマブ 1 mg/kg の単回又は反復静脈内投与群及び 1 又は 10 mg/kg の皮下投与群で、脾臓（軽微～中等度）、リンパ節（軽微～中等度）及び GALT（軽度）でリンパ球密度の減少が確認された。0.1 mg/kg の単回静脈内又は皮下投与群の雄、及び同用量の反復静脈内投与群又は月 1 回皮下投与群の雌で、程度は弱いものの同様の所見が認められた。0.01 又は 0.1 mg/kg を反復静脈内投与した雄で、エプコリタマブに対する免疫原性を示す可能性がある脾臓及び下顎リンパ節のリンパ球数増加が認められた。6 週間の休薬期間後にもリンパ球数の減少が認められたが、重症度は軽度であった。静脈内及び皮下投与経路とも忍容性は良好であり、投与部位にエプコリタマブに関連する病理組織学的変化は認められなかった。

カニクイザルにエプコリタマブを 0.01、0.1 又は 1 mg/kg の用量で週 1 回、5 週間静脈内投与した結果、すべての用量で血液学的変化及び B 細胞性リンパ球サブポピュレーションの変化が認められたと結論された。0.1 mg/kg 以上の群では、脾臓の白脾髄濾胞、リンパ節濾胞及び GALT でリンパ球密度の減少が認められた。6 週間の投与後観察期間中、所見は回復傾向を示した。1 mg/kg 群の 1 例は、サイトカインの増加に伴う一般状態の悪化により安楽死させた。これらの所見に基づき、静脈内投与の NOAEL は 0.1 mg/kg と考えられた。

エプコリタマブを最大 10 mg/kg の用量で月 1 回皮下投与したときの忍容性は良好であり、すべての用量で血液学的変化及びリンパ球サブポピュレーションの変化が認められた。1 又は 10 mg/kg で、脾臓の白脾髄濾胞、リンパ節濾胞及び GALT でリンパ球密度の減少が観察された。局所注射反応は認められなかった。これらの所見に基づき、皮下投与による NOAEL は 10 mg/kg と考えられた。

3.3　エプコリタマブ：13 週間反復投与毒性試験

カニクイザルを用いたエプコリタマブの 13 週間反復投与毒性試験は、日米欧の各地域（PMDA、FDA、EMEA）での第 III 相試験及び承認申請のための実施が免除されている（FDA Type B End of Phase 1、20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日、Reference ID:[redacted];EMEA Scientific Advice Procedure No.:[redacted]；医薬品医療機器総合機構[redacted]相談、20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日、#[redacted]）。

カニクイザルを用いたエプコリタマブの毒性試験では、複数の用量段階及び投与経路でエプコリタマブに対する抗体産生の可能性を評価した。これらの試験結果から、エプコリタマブはカニクイザルで免疫原性を有する可能性が高く、その結果として、エプコリタマブの全身曝露量が減少することが示された。ADA 反応を克服する可能性のある手段として高用量のエプコリタマブを投与する選択肢は、エプコリタマブの薬理学的作用機序に関連する忍容性の問題により制限されると考えられる。したがって、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験で、忍容性の問題を回避しつつ、エプコリタマブの十分な曝露量を確保するための許容量を設定することはできないと考えられる。

4.　遺伝毒性

バイオ医薬品はデオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid、DNA）や他の染色体成分に直接相互作用するとは予想されないことから、ICH S6(R1)ガイドラインに従い、従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の種類と範囲はバイオ医薬品に対して適用されないと考えられる。

5.　がん原性

ICH ガイドライン（S1A、S6(R1)、S9）に従い、がん原性試験は一般的に mAb 及び関連製剤を含むバイオ医薬品には適用されず、進行した全身性疾患の治療を目的とする抗がん剤にも必要とされない。さらに、エプコリタマブには細胞周期に関連する既知の作用はなく、DNA に影響を及ぼさないと予想される。

6.　生殖発生毒性

生殖発生毒性試験は実施していないが、ICH S9 ガイドラインに従い、カニクイザルを用いた一般毒性試験で雌雄生殖器に対するエプコリタマブの影響を評価した。主要な GLP 適用毒性試験（[[redacted]503484]）では、エプコリタマブを 0、0.01、0.1 及び 1 mg/kg の用量で週 1 回、5 回静脈内投与した。エプコリタマブは、Day 1 及び 29 に 0.1、1 及び 10 mg/kg の用量で皮下投与も行った。本試験での投与開始時の動物年齢は約 4～6 歳齢であった。雄又は雌の生殖器にエプコリタマブに関連した剖検所見及び病理組織学的所見は認められなかった。

ICH S9 に従い、進行がん患者を対象としたエプコリタマブの使用に関して、受胎能及び初期胚発生に関する試験、並びに出生前及び出生後の発生毒性試験は実施しなかった。胚・胎児発生毒性の評価については、カニクイザルでエプコリタマブが免疫原性を有する可能性が高いこと、及びエプコリタマブの毒性評価に適した他の動物種が特定されていないことから、特化した試験は計画していない（8.1 項）。カニクイザルを用いたエプコリタマブの胚・胎児発生毒性試験は、日米欧の各地域（PMDA、FDA、EMEA）での第 III 相試験及び承認申請のための実施が免除されている。

したがって、エプコリタマブの胚・胎児発生毒性のリスク評価は、エプコリタマブの作用機序及び他の B 細胞標的薬（[SUB-017262]）からの関連情報を考慮に入れたエビデンスの重み付けアプローチに基づいている。

エプコリタマブは、通常のヒト IgG1 構造を有し、胎児性 Fc 受容体（neonatal Fc receptor、FcRn）（Engelberts et al, 2020）への結合を含むヒト IgG1 抗体に典型的な生化学的特性を有する。ヒト IgG1 抗体は、FcRn と結合することにより胎盤を通過することが知られている（Palmeira et al, 2012）。胎盤関門を通過する CD20 を標的とする他の薬剤（リツキシマブ、オファツムマブ）を用いた動物試験では、これらの薬剤を妊娠動物の器官形成期に投与しても催奇形性は認められなかった（Bellot et al, 2021; Vaidyanathan et al, 2011）。しかし、リツキシマブ及びオファツムマブを投与した妊娠カニクイザルの出生児では、B 細胞数減少及び免疫抑制がみられ、生後 6 ヵ月以内に B 細胞数は正常値に回復し、免疫機能は回復した（Bellot et al, 2021; Vaidyanathan et al, 2011）。高用量のオファツムマブを投与したサルの出生児 3 例が周産期に死亡した。この死亡は、薬理学的に誘導された免疫抑制（すなわち、B 細胞枯渇）に続発した可能性のある感染によるものであった。また、公表されているリツキシマブのヒト妊娠転帰データのシステマチックレビューでは、子宮内でリツキシマブに曝露された乳児に、持続期間が一般に 6 ヵ月未満の B 細胞性リンパ球減少症が発現する可能性があることが示された（Das et al, 2018）。

以上のことから、エビデンスの重み付けアプローチに基づくと、エプコリタマブは妊娠した母親から胎児に移行する可能性があり、その作用機序に基づくと、胎児がエプコリタマブに曝露されると、子宮内曝露された乳児で B 細胞性リンパ球減少症及び正常な免疫応答の変化など、有害ではあるが可逆的な発達転帰が生じる可能性があると考えられる。

7.　局所刺激性

バイオ医薬品に関する ICH S6(R1)ガイドラインに準拠して、サルでの主要な GLP 適用毒性試験（[[redacted]503484]）の一環として、エプコリタマブ原薬の局所刺激性を評価した。独立した試験は実施しなかった。静脈内投与部位及び皮下投与部位の検査では、エプコリタマブに関連した一般状態の変化又は病理組織学的な局所刺激性は認められなかった。投与部位の所見は投与手技を反映していた。静脈内投与用の溶媒として、0.9%生理食塩液、皮下投与用の溶媒として 150 mmol/L ソルビトールを含む pH 5.5 の 30 mmol/L 酢酸緩衝液をそれぞれ使用した。

8.　その他の毒性試験

8.1　動物種の確認試験

フローサイトメトリーを用いた動物種交差反応性試験（[GMB3013-034]）では、エプコリタマブはヒト及びカニクイザルの CD20 発現ヒト胎児腎細胞（human embryonic kidney cell、HEK）に同程度の EC_{50} 値（約 0.4 µg/mL）で結合し、ウサギの CD20 にはより高い EC_{50} 値（1.04 µg/mL）で結合したが、評価した他の動物種（イヌ、ブタ、ラット、マウス）の CD20 には結合しなかった。エプコリタマブとヒト以外の CD3 との種交差反応性の結論は、IgG1-CD3-FEAL（エプコリタマブの CD3 特異的 Fab アームに対する親抗体）の Fab フラグメントの X 線結晶構造解析に基づいている。エプコリタマブの CD3 特異的 Fab アームの由来となるマウス CD3ε 特異的カニクイザル交差反応性抗体 SP34 に関する公表されている結合データ（Conrad et al, 2007）では、霊長類 13 種の CD3 と交差反応性を示すが、検討した他の動物種の CD3 とは交差反応性を示さない。エプコリタマブはカニクイザル由来の末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell、

PBMC）で機能的な活性を示し、T 細胞活性化及び細胞毒性の用量依存的な誘導が認められた。これらの試験に基づき、カニクイザルはエプコリタマブの非臨床安全性評価に最も適切な動物種であると考えられる。この動物種は、エプコリタマブが CD3 及び CD20 の両方に結合することが確認された唯一の動物種である。

8.2　免疫原性

エプコリタマブに対する抗体産生の可能性を単回及び反復投与試験、並びにすべての用量及び投与経路で評価したところ、エプコリタマブはサルで免疫原性を示す可能性が高かった。

カニクイザルを用いたエプコリタマブの静脈内投与及び皮下投与による 5 週間毒性試験（[■■■503484]）の結果の要約を Table 7 に示す。0.01 又は 0.1 mg/kg を Day 15 及び Day 29 に投与した大部分の動物で ADA 反応が観察されたため、これら 2 つの最低用量では反復投与日での TK パラメーターのデータは得られなかった。

Table 7　抗エプコリタマブ抗体陽性動物の概要

Dose (mg/kg)	Group/sex	Route	Pre	Day 15	Day 22	Day 29	Day 72
0.01	2/M	IV (Q1W × 5)	0/3[a]	3/3	3/3	3/3	N/A
0.1	3/M	IV (Q1W × 5)	0/3	3/3	3/3	3/3	N/A
1.0	4/M	IV (Q1W × 5)	0/5	1/5	3/5	3/5	1/2
0.1	5/M	IV (SD)	0/3	3/3	3/3	3/3	N/A
1.0	6/M	IV (SD)	0/3	0/3	1/3	1/3	N/A
0 + 0.1	7/M	SC (2 × SD)	0/3	2/3	2/3	2/3	N/A
0 + 1.0	8/M	SC (2 × SD)	0/3	1/3	2/3	2/3	N/A
0 + 10	9/M	SC (2 × SD)	0/3	0/3	1/3	1/3	N/A
0.01	2/F	IV (Q1W × 5)	0/3	3/3	3/3	3/3	N/A
0.1	3/F	IV (Q1W × 5)	0/3	3/3	3/3	3/3	N/A
1.0	4/F	IV (Q1W × 5)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2
0.1	5/F	IV (SD)	0/3	3/3	3/3	3/3	N/A
1.0	6/F	IV (SD)	0/3	0/2	0/2	1/2	N/A
0 + 0.1	7/F	SC (2 × SD)	0/3	3/3	3/3	3/3	N/A
0 + 1.0	8/F	SC (2 × SD)	0/3	2/3	3/3	3/3	N/A
0 + 10	9/F	SC (2 × SD)	0/3	0/3	0/3	0/3	N/A

F = Females; IV = intravenous; M = Males; Pre = Pre-treatment; Q1W × 5 = once a week IV for five occasions (Days 1, 8, 15, 22, and 29), IV (SD) single IV dose (Day 1), SC (2 × SD) single SC dose with epcoritamab and its vehicle on Days 1 and 29 (separate injection sites in same animal); SC = subcutaneous; SD = single dose

N/A Not applicable; no recovery samples collected.

a　Values represent the number of animals with an ADA response/total number of animals in that group

8.3　溶血性

血漿適合性評価（[■■■301352]）と共に、エプコリタマブのヒト血液の溶血性を in vitro で評価した。エプコリタマブ（1 µg/mL 及び 20 µg/mL）はヒト全血に対して非溶血性であり、ヒト血漿中での沈殿又はヒト全血中での赤血球凝集の徴候は認められなかった。

8.4　サイトカイン放出

サイトカイン放出アッセイ（ProStorm® サイトカイン放出アッセイ、[32318]）を実施し、ヒト全血でのエプコリタマブを介したサイトカイン放出の可能性を評価した。PBMC のみを用いたアッセイと比較してより完全な評価を行うため、全血アッセイを選択した。抗体の固定化に伴う CD 3 架橋形成の可能性を避けるため、可溶性アッセイ法を選択した。

本試験では、エプコリタマブを 30 名の健康被験者から採取した未希釈の全血とインキュベートした。ヘパリンナトリウム入り採血管に血液を採取し、採血後 3 時間以内に使用した。24 時間インキュベーション後に血漿を分離し、標準曲線の定量後に ProArray Ultra®プラットフォームを用いて IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IFNγ 及び TNFα の濃度を分析した。PBS とブドウ球菌エンテロトキシン B（Staphylococcal enterotoxin B、SEB）をアッセイ陰性及び陽性対照として用いた。陽性対照である SEB は、すべての被験者の試料で高レベルのサイトカイン放出を誘導し、被験者の細胞がサイトカイン産生機能を有することを確認したが、陰性対照（PBS）は、すべての被験者の試料でサイトカイン放出を誘導しなかった。80 pg/mL の検出閾値は、陰性対照（培地のみ）の繰り返し（12 回）で得られた平均シグナルを上回る 2 標準偏差内で所定の濃度を測定することにより決定した。

エプコリタマブは、検討した最高 5 濃度（1600 pg/mL 以上）でサイトカイン放出と関連していた。濃度反応で最も明らかな傾向で放出されたサイトカインは、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、IFNγ 及び TNFα であった。エプコリタマブ濃度が 320 pg/mL 以下では、IL-4 に濃度依存的な反応は認められず、サイトカイン濃度も検出されなかった。

全被験者 30 名のエプコリタマブ関連反応の中央値を Table 8 に示す。

Table 8　サイトカイン濃度の中央値

	SEB	Epcoritamab (test concentration in pg/mL)									
		1.00E+6	2.00E+5	4.00E+4	8.00E+3	1.60E+3	3.20E+2	6.40E+1	1.28E+1	2.56E+0	5.12E-1
IL-2	17917	128	158	109	95	0	0	0	0	0	0
IL-4	83	33	59	40	39	0	0	2	0	0	3
IL-6	5471	874	1042	739	166	49	0	0	0	0	0
IL-8	20464	2138	3399	1954	573	154	0	0	8	1	0
IL-10	1227	286	386	296	119	18	0	26	18	8	0
IFNγ	17218	423	485	292	78	117	0	77	51	38	0
TNFα	6368	170	188	76	43	0	0	0	0	0	0

IFN = interferon; IL = interleukin; SEB = Staphylococcal enterotoxin B (positive control); TNF = tumor necrosis factor

濃度反応関係を更に検討するために、被験者 30 名のサイトカイン放出アッセイのデータも、4 つのパラメーターの非線形回帰分析［GraphPad Prism 7.02、論理方程式（アゴニスト）vs.反応-勾配変化］を用いて評価した。この解析には十分な用量反応性を有するドナーのみを含めた。特定のサイトカイン IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、TNFα 及び IFNγ について、エプコリタマブに関連したサイトカイン放出の EC_{20}、EC_{50} 及び EC_{90} 値を[GMB3013-054]に要約した。

加えて、DuoBody-CD3xctrl（CD20 結合アームなし）及び IgG1-CD3-FEAL（2 つの CD3 結合アームと CD20 結合アームのない抗 CD3 親抗体）によるサイトカイン放出能を全血アッセイで評価した（ProStorm®サイトカイン放出アッセイ、[32400]）。本試験では、5 名の健康な被験者から採取した全血試料を 0.512～1×10^6 pg/mL の濃度範囲の対照物質とインキュベートした。30 名のドナー試験で観察されたエプコリタマブによるサイトカイン放出とは対照的に、DuoBody-CD3xctrl 及び IgG1-CD3-FEAL による被験者から採取された全血でのサイトカイン反応の誘導は極めて低かった。

以上のことから、サイトカイン放出試験の結果は、エプコリタマブの予想される薬理作用及びエプコリタマブを投与したカニクイザルの所見と一致している。これらはハザードの特定を目的とし、リスク緩和計画に情報を提供することを意図したものであり、リスクの定量化を意図したものではない（Vidal et al, 2010）。

8.5　組織交差反応性試験

ヒト及びカニクイザルの正常組織の包括的パネルを用いて TCR 試験を実施し、エプコリタマブの交差反応性を評価した。

最初の試験方法の開発試験（[redacted 8361457]）は、対照組織及び特定のヒト組織（被験者 1 名）の凍結切片を用いて実施した。組織生存率の評価は、ヒト組織パネルが生存可能であることを示した。スライドを用いて対照抗体価を測定した後、一連の組織の抗体価測定に使用するエプコリタマブ-FITC の濃度として、2.5、5 及び 10 µg/mL の 3 種類［フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate、FITC）で標識］を選択した。

一連の組織に対する抗体価測定の結果から、陽性対照物質（ヒト扁桃腺）でのエプコリタマブの抗原特異的結合が示された。FITC 標識アイソタイプ対照抗体（IgG1-b12-LFLEDA-K409R-FITC）及び抗体希釈液では、滴定で検討した濃度で同様の染色は認められなかった。エプコリタマブは、リンパ系組織（リンパ節、脾臓、胸腺）で単核細胞（B/T リンパ球）を特異的に染色し、その大部分は細胞膜であった。加えて、主に単核細胞（B/T リンパ球）の細胞膜染色も、検討した他の大部分の組織の間質細胞凝集体と散在性／個別細胞で観察された。この染色パターンは、正常組織で予想される B/T リンパ球の組織分布と一致している。

GLP 適用 TCR 試験（[redacted 8361454]）では、対照組織の凍結切片及び包括的な検査用組織パネルを、ヒト及びカニクイザルの特定の組織（別々の 40 組織；各組織に 3 名のドナー）から調製した。組織生存性の評価は、組織パネルが生存可能であることを示した。対照抗体価測定のスライドによる評価後、一連の組織パネルの抗体価測定に使用するエプコリタマブの濃度として 0.625、1.25 及び 2.5 µg/mL の 3 種類を選択した。

陽性対照物質（ヒト扁桃腺）で、エプコリタマブの抗原特異的結合が示された。ヒト及びカニクイザルの組織パネルを用いた抗体価測定で検討した濃度では、FITC 標識対照抗体及び抗体希釈液で同様の染色は認められなかった。ヒト及びカニクイザルのリンパ組織で、エプコリタマブは単核細胞（B/T リンパ球）を特異的に染色し、主に細胞膜で染色された（胃前庭部、胃体部、十二指腸、回腸及び結腸内のリンパ節、脾臓、胸腺、扁桃及び粘膜関連／消化管リンパ組織）。また、検討した他のヒト及びカニクイザルの大部分の組織では、間質細胞の凝集体及び散在性／

個別の細胞で、主に単核細胞（B/T リンパ球）の細胞膜染色も認められた。エプコリタマブの染色強度は、検討したヒト及びカニクイザルの組織で同程度であった。ヒト及びカニクイザルのいずれの組織でも、予想外の特異的染色は認められなかった。

以上のことから、これらの TCR 試験でのエプコリタマブの染色パターンは、ヒト及びカニクイザルの正常組織で予想される B/T リンパ球の組織分布と一致している。

9. 考察及び結論

エプコリタマブの毒性試験プログラムは、最新の ICH S1A、S2(R1)、S5(R3)、S6(R1)、S9、S9 の Q&A、S10、M3(R2)ガイダンスを十分に考慮して計画されており、主要な in vivo 毒性試験は GLP に準拠した。

エプコリタマブの承認販売申請を裏付けるための非臨床安全性パッケージは、in vitro 動物種間結合性検討、ヒト細胞及び組織を用いた in vitro 安全性試験（サイトカイン放出試験、交差反応性試験、溶血性試験及び血漿適合性試験）、並びにカニクイザルを用いた安全性薬理及び局所刺激性評価を含む in vivo 試験、並びに作用機序を考慮したエプコリタマブの胚・胎児発生リスク評価のためのエビデンスの重み付けアプローチから構成される。

エプコリタマブは、ヒト及びカニクイザルの CD3 及び CD20 に対して同程度に結合すること、カニクイザル細胞において in vitro で薬理学的活性を示すこと、げっ歯類の CD3 及び CD20 と交差反応しないことから、毒性試験に用いる動物種としてカニクイザルを選択した。エプコリタマブは、カニクイザルでエプコリタマブの作用機序と一致するサイトカイン放出、末梢血 B 細胞の枯渇、リンパ系組織（脾臓、種々のリンパ節、GALT）でのリンパ球密度減少といった薬理作用を in vivo で示すことが確認されている。

サルを用いた毒性評価では、全身曝露量を増大させて毒性プロファイルを十分に明らかにするために、エプコリタマブを 1 mg/kg 以下の用量で反復（週 1 回）静脈内投与した。皮下投与による臨床投与を支持するため、GLP 適用試験でのブリッジングによる毒性評価と共に、エプコリタマブをカニクイザルに皮下投与したときの安全性、生物学的利用率及び局所刺激性を評価した。

In vitro 安全性試験では、ヒト全血アッセイでエプコリタマブのサイトカイン放出が認められた。エプコリタマブはヒト全血の溶血を引き起こさず、ヒト血液及び血漿と適合した。ヒト組織の包括的パネルを用いた GLP 適用 TCR 試験では、エプコリタマブの結合はほとんどのヒト組織の単核細胞に限定されていた。CD3 及び CD20 はそれぞれ T 細胞及び B 細胞に発現しているため、ヒト組織パネル全体の血液中リンパ球及び単核細胞の染色は予想された反応性を示した。

カニクイザルを用いた GLP 適用 in vivo 毒性試験では、エプコリタマブに関連した用量依存的な有害な臨床徴候［嘔吐、活動性低下及び死亡を含む（1 mg/kg 静脈内投与群の 1 例）］、並びにサイトカイン放出が認められ、初回投与後により顕著であった。総白血球数及びリンパ球数の可逆的な血液学的変化、末梢血中の可逆的 B 細胞枯渇、可逆的なリンパ組織のリンパ球密度の減少が認められた。カニクイザルにエプコリタマブを皮下及び静脈内投与したとき、エプコリタマブに関連した局所刺激性は認められず、心血管系、呼吸系及び神経系に対する有害作用も確認されなかった。カニクイザルでの最高サイトカイン濃度は、同用量を静脈内投与と皮下投与で比較した場合、皮下投与の方がおおむね低かったが、B 細胞枯渇作用は同程度であった。さらに、プライミングドーズを投与した後にエプコリタマブを静脈内投与すると、サイトカイン放出量が低下した。これらの結果は、皮下投与経路及び臨床でのプライミングドーズの使用の根拠を裏付けるものである。

胚・胎児発生に対するエプコリタマブのリスクを評価するためのエビデンスの重み付けアプローチに基づき、エプコリタマブが FcRn に結合することにより、胎盤を介して母体から発生中

の胎児に移行する可能性があると考えられる。胎児がエプコリタマブに曝露されると、子宮内曝露された乳児で、B 細胞性リンパ球減少症及び正常な免疫応答の変化を含む、有害ではあるが可逆的な発達転帰が生じる可能性がある。

総括的結論

エプコリタマブの毒性試験プログラムには、エプコリタマブの毒性プロファイルの特性評価が含まれ、エプコリタマブの臨床開発をサポートし、本製造販売承認申請をサポートするために必要なデータが含まれている。カニクイザルでの用量制限毒性が明らかにされている。エプコリタマブに関連して、高用量では毒性と考えられる概して用量依存的な一般状態の変化（嘔吐、活動性低下、死亡を含む）、及び初回投与後により顕著なサイトカイン放出が認められた。可逆的な血液学的変化、末梢血中の可逆的な B 細胞枯渇、及び様々なリンパ系組織での胚中心のリンパ球密度の可逆的な減少が認められた。カニクイザルにエプコリタマブを皮下投与しても、エプコリタマブに関連する局所刺激性所見は認められなかった。エビデンスの重み付けアプローチに基づき、エプコリタマブは子宮内曝露された乳児で、B 細胞性リンパ球減少症及び正常な免疫応答の変化を含む有害な発達転帰をもたらす可能性があると考えられる。

以上のことから、エプコリタマブの全体的な安全性プロファイルは非臨床毒性試験で十分に明らかにされ、B 細胞性悪性腫瘍に対する皮下投与での使用が裏付けられる。非臨床試験で特定された安全性リスクは、概してモニタリング可能であり、がん患者に対するエプコリタマブの良好なリスクベネフィットバランスが示されたと考えられる。

10. 参考文献

Barbas, C. F., 3rd, Collet, T. A., Amberg, W., Roben, P., Binley, J. M., Hoekstra, D., Cababa, D., Jones, T. M., Williamson, R. A., Pilkington, G. R., et al. (1993). Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. J Mol Biol 230, 812-823.

Bellot, M., Luetjens, C. M., Bagger, M., Horvath, C., Sutter, E., DeLise, A., Brees, D., Carballido, J. M., Pingili, R., Ramanathan, K., et al. (2021). Effect of ofatumumab on pregnancy, parturition, and lactation in cynomolgus monkeys. Reprod Toxicol 108, 28-34.

Conrad, M. L., Davis, W. C., and Koop, B. F. (2007). TCR and CD3 antibody cross-reactivity in 44 species. Cytometry A 71, 925-933.

Das, G., Damotte, V., Gelfand, J. M., Bevan, C., Cree, B. A. C., Do, L., Green, A. J., Hauser, S. L., and Bove, R. (2018). Rituximab before and during pregnancy: A systematic review, and a case series in MS and NMOSD. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 5, e453.

Engelberts, P. J., Hiemstra, I. H., de Jong, B., Schuurhuis, D. H., Meesters, J., Beltran Hernandez, I., Oostindie, S. C., Neijssen, J., van den Brink, E. N., Horbach, G. J., et al. (2020). DuoBody-CD3xCD20 induces potent T-cell-mediated killing of malignant B cells in preclinical models and provides opportunities for subcutaneous dosing. EBioMedicine 52, 102625.

Labrijn, A. F., Meesters, J. I., de Goeij, B. E., van den Bremer, E. T., Neijssen, J., van Kampen, M. D., Strumane, K., Verploegen, S., Kundu, A., Gramer, M. J., et al. (2013). Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 5145-5150.

Labrijn, A. F., Meesters, J. I., Priem, P., de Jong, R. N., van den Bremer, E. T., van Kampen, M. D., Gerritsen, A. F., Schuurman, J., and Parren, P. W. (2014). Controlled Fab-arm exchange for the generation of stable bispecific IgG1. Nat Protoc 9, 2450-2463.

Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A. L., Zago, C. A., and Carneiro-Sampaio, M. (2012). IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. Clin Dev Immunol 2012, 985646.

Pessano, S., Oettgen, H., Bhan, A. K., and Terhorst, C. (1985). The T3/T cell receptor complex: antigenic distinction between the two 20-kd T3 (T3-delta and T3-epsilon) subunits. EMBO J 4, 337-344.

Teeling, J. L., French, R. R., Cragg, M. S., Van Den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P. W., Hack, C. E., Dechant, M., et al. (2004). Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. Blood 104, 1793-1800.

Teeling, J. L., Mackus, W. J., Wiegman, L. J., van den Brakel, J. H., Beers, S. A., French, R. R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J. W., et al. (2006). The Biological Activity of Human CD20 Monoclonal Antibodies Is Linked to Unique Epitopes on CD20. Journal of Immunology 177, 362-371.

Vaidyanathan, A., McKeever, K., Anand, B., Eppler, S., Weinbauer, G. F., and Beyer, J. C. (2011). Developmental immunotoxicology assessment of rituximab in cynomolgus monkeys. Toxicol Sci 119, 116-125.

Vidal, J. M., Kawabata, T. T., Thorpe, R., Silva-Lima, B., Cederbrant, K., Poole, S., Mueller-Berghaus, J., Pallardy, M., and Van der Laan, J. W. (2010). In vitro cytokine release assays for predicting cytokine release syndrome: the current state-of-the-science. Report of a European Medicines Agency Workshop. Cytokine 51, 213-215.

目次

1. 毒性試験：一覧表 5
2. トキシコキネティクス試験の一覧表 8
3. トキシコキネティクス試験成績の一覧 9
4. 被験物質（バッチ毎）一覧 13
5. 単回投与毒性試験 15
6. 反復投与毒性試験：主要な試験以外の試験 17
7. 反復投与毒性試験：主要な試験 19
8. In vitro 遺伝毒性試験 36
9. In vivo 遺伝毒性試験 36
10. がん原性試験 36
11. 生殖発生毒性試験：主要な試験以外の試験 36
12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 36
13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 36
14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 36
15. 新生児を用いた試験 36
16. 局所刺激性 37
17. その他の毒性試験 38
18. 参考文献 41

表目次

Table 1　エプコリタマブ及び関連抗体一覧 4

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
AUC	area under the concentration-time curve	薬物濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{0-t}	area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration	0 時間から最終定量可能時点までの AUC
AUC_{0-7d}	area under the concentration-time curve from time zero to time t=7 days	投与後 7 日までの AUC
AUC_{0-inf}	area under the concentration-time curve from time zero to time to infinity	0 時間から無限大時間までの AUC
CD	cluster of differentiation	CD 分類
CD3	surface antigen on T cells, subunit of the T cell receptor complex	T 細胞上の表面抗原、T 細胞受容体複合体のサブユニット
CD4	T cell surface antigen specific for the T helper cell subpopulation	ヘルパーT 細胞サブセットに特異的な T 細胞表面抗原
CD8	Surface antigen present on most cytotoxic T cells and NK cells	ほぼすべての細胞傷害性 T 細胞及び NK 細胞に存在する表面抗原
CD19	surface antigen, pan-B cell receptor protein	表面抗原、汎 B 細胞受容体タンパク質
CD20	surface antigen, pan-B cell marker	表面抗原、pan-B 細胞マーカー
CD25	late activation marker of T cells	T 細胞の後期活性化マーカー
CD45	leukocyte common antigen	白血球共通抗原
CFU	colony forming unit	コロニー形成単位
C_{max}	the maximum observed concentration observed after dosing	最高濃度
[redacted]	[redacted]	－
CRS	cytokine release syndrome	サイトカイン放出症候群
EC_{50}	50% effective concentration	50%効果濃度
EU	endotoxin unit	エンドトキシン単位
F	female	雌
Fab	fragment antigen binding	－
Fc	fragment crystallizable	－
FEA	inertness mutations L234F/L235E/D265A	不活性変異 L234F、L235E、D265A
FEAL	L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody mutations	L234F/L235E/D265A 不活性、F405L DuoBody 変異
FEAR	L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody mutations	L234F/L235E/D265A 不活性、K409R DuoBody 変異
FITC	fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
GALT	gut-associated lymphoid tissue	腸管関連リンパ組織
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学
IFN	interferon	インターフェロン

略語・略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IL	interleukin	インターロイキン
IV	intravenous	静脈内
LMW	low molecular weight form	低分子量体
M	male	雄
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	単球走化性タンパク質-1
NA	not applicable	該当せず
$nAUC_{0\text{-}7d}$	$AUC_{0\text{-}7d}$ normalized for the dose received	投与量補正した $AUC_{0\text{-}7d}$
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
Q1W	once weekly	週 1 回
SC	subcutaneous	皮下
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
t_{max}	time after dosing at which the maximum observed concentration is observed	最高濃度到達時間

化合物の命名法

エプコリタマブの開発中、最終製品を構成する 2 つの抗体成分及び最終製品には、異なる名称及び製品コードを使用した。加えて、開発プログラム中に様々な試験で対照抗体を評価した。Module 2.6.6 及び 2.6.7 にはエプコリタマブの結果のみを要約した。非臨床試験の報告書、モジュール及び要約の確認を容易にするためにエプコリタマブ及び関連抗体一覧を Table 1 に示す。

Table 1 エプコリタマブ及び関連抗体一覧

Product Code	Nonclinical Code	Description
Epcoritamab	DuoBody-CD3xCD20; GEN3013; BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR	Bispecific IgG1 antibody that contains a CD3-specific Fab arm, a CD20-specific Fab arm, and with Fc silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone
NA	Epcoritamab-FITC; DuoBody-CD3xCD20-FITC; GEN3013-FITC; BisG1-huCACAO-FEAL/7D8-FEAR-FITC	FITC-labeled bispecific IgG1 antibody that contains a CD3-specific Fab arm, a CD20-specific Fab arm and with Fc silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone
NA	DuoBody-CD3xctrl; BisG1-huCACAO-FEAL/b12-LFLEDA-K409R	Bispecific IgG1 antibody that contains a CD3 specific Fab arm identical to epcoritamab, a non-binding control (ctrl) Fab arm, and Fc silencing (FEA) and DuoBody (F405L, K409R) mutations in the Fc backbone
3005a	IgG1-CD3-FEAL; IgG1-huCACAO-FEAL	Bivalent CD3-specific IgG1 mAb with Fc silencing (FEA) and DuoBody (F405L) mutations in the Fc backbone; parental antibody for epcoritamab
NA	IgG1-ctrl-FEAR-FITC; IgG1-b12-LFLEDA-K409R-FITC	FITC-labeled bivalent non-binding control IgG1 antibody, with Fc silencing (FEA) and DuoBody (K409R) mutations in the Fc backbone

CACAO: cross-reactive anti-CD3 antibody one; CD: cluster of differentiation; ctrl: control [non-binding control Fab arm derived from the anti-human immunodeficiency virus (HIV) glycoprotein 120 (gp 120) antibody IgG1-b12 (Barbas et al, 1993)]; Fab: fragment antigen binding; Fc: fragment crystallizable; FEA: inertness mutations L234F/L235E/D265A; FEAL: L234F, L235E and D265A inertness, F405L DuoBody mutations; FEAR: L234F, L235E and D265A inertness, K409R DuoBody mutations; FITC: fluorescein isothiocyanate; IgG: immunoglobulin G; mAb: monoclonal antibody; NA: not applicable

1.　毒性試験：一覧表

Test Article: Epcoritamab

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose or Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Single-Dose Toxicity[a]								
A Single-Dose Toxicity Study of GEN3013 by Intravenous Injection in Cynomolgus Monkeys	Monkey/Cynomolgus	IV, infusion	1 day	IV: 0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg	No	[redacted]-UK	[[redacted] 529668]	4.2.3.1-1
Repeat-Dose Toxicity								
A Dose Range-Finding Study of GEN3013 by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Recovery Period	Monkey/Cynomolgus	IV, infusion IV, infusion SC	Weekly × 4 2 day[a] 1 day[a]	IV: 0.01, 0.1, 1 mg/kg IV: 0.01 (priming) + 1 mg/kg SC: 0.01, 0.1, 1, 10, 20 mg/kg	No	[redacted]-UK	[[redacted] 501775]	4.2.3.2-1
A 5-Week Toxicity Study of GEN3013 by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Bioavailability, Local Tolerance, and a 6-Week Recovery Period	Monkey/Cynomolgus	IV, infusion IV, infusion SC	Weekly × 5 1 day[a] 2 day[a, b]	IV: 0.01, 0.1, 1 mg/kg IV: 0.1, 1 mg/kg SC: 0.1, 1, 10 mg/kg	Yes	[redacted]-UK	[[redacted] 503484]	4.2.3.2-2

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose or Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Other Toxicity Studies								
Evaluation of species cross-reactivity of DuoBody-CD3xCD20	mouse, rat, rabbit, dog, pig, monkey (cynomolgus), human	In vitro	NA	0.03-30 µg/mL	No	Genmab B.V.	[GMB3013-034]	4.2.3.7.7-1
ProStorm® Cytokine Release Assay (30 donors)	Human	In vitro	NA	0.512-1 × 10^6 pg/mL	No	[redacted]	[32318]	4.2.3.7.7-2
ProStorm® Cytokine Release Assay (5 donors)	Human	In vitro	NA	0.512-1 × 10^6 pg/mL	No	[redacted]	[32400][c]	4.2.3.7.7-3
Evaluation of Cytokine Release in Whole Blood induced by DuoBody CD3xCD20 ex vivo	Human	In vitro	NA	0.512-1 × 10^6 pg/mL	No	Genmab B.V.	[GMB3013-054][d]	4.2.3.7.7-4
Evaluation of the Hemolytic Potential of GEN3013 in Human Whole Blood and Plasma Compatibility Assessment	Human	In vitro	NA	0, 1 or 20 µg/mL	Yes	[redacted]-UK	[redacted]301352]	4.2.3.7.7-5
Development of an Immunohistochemical Staining Method for the Demonstration of Specific Positive Staining of GEN3013 in Control Material and Assessment of Potential Cross-Reactivity in a Selected Panel of Human Tissues	Human	In vitro	NA	0, 2.5, 5, 10 µg/mL	No	[redacted]-UK	[redacted]8361457]	4.2.3.7.7-6
Assessment of the Potential Cross-Reactivity of	Human, Monkey/Cynomolgus	In vitro	NA	0, 0.625, 1.25, 2.5 µg/mL	Yes	[redacted]-UK	[redacted]8361454]	4.2.3.7.7-7

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose or Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Other Toxicity Studies								
GEN3013 with a Selected Panel of Human and Cynomolgus Monkey Tissues								
Genotoxicity In Vitro No specific studies conducted.								
Genotoxicity In Vivo No specific studies conducted.								
Carcinogenicity No specific studies conducted.								
Reproductive and Development Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development to Implantation No specific studies conducted.								
Reproductive and Development Toxicity: Effects on Embryofetal Development No specific studies conducted.								
Reproductive and Development Toxicity: Effects on Pre and Postnatal Development Including Maternal Function No specific studies conducted.								
Studies in Juvenile Animals No specific studies conducted.								
Local Tolerance No specific studies conducted. Local tolerance of epcoritamab was assessed as part of the pivotal GLP toxicity study in cynomolgus monkeys ([503484])								

a Single dose IV or SC groups were included in the study designs of the repeat-dose studies; these single-dose studies are presented with their respective repeat-dose main study.
b In this study, epcoritamab (GEN3013) was administered SC on Days 1 and 29; toxicokinetics were evaluated on Day 1 (single dose); local tolerance was evaluated for the Days 1 and 29 SC injection sites.
c This report describes results of the ProStorm Cytokine Storm Assay Study [32400], which evaluated the controls, DuoBody-CD3xctrl and IgG-CD3-FEAL.
d This report summarizes calculations of EC_{20}, EC_{50}, and EC_{90} values as performed at Genmab using data from ProStorm Cytokine Release Assays, Study [32318], and Study [32400].

2.　トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Epcoritamab

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose or Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Single-Dose Toxicity[a]								
A Single-Dose Toxicity Study of GEN3013 by Intravenous Injection in Cynomolgus Monkeys	Monkey/Cynomolgus	IV, infusion	1 day	IV: 0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg	No	[redacted]-UK	[redacted] 529668]	4.2.3.1-1
Repeat-Dose Toxicity								
A Dose Range-Finding Study of GEN3013 by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Recovery Period	Monkey/Cynomolgus	IV, infusion IV, infusion SC	Weekly × 4 2 day[a] 1 day[a]	IV: 0.01, 0.1, 1 mg/kg IV: 0.01 (priming) + 1 mg/kg SC: 0.01, 0.1, 1, 10, 20 mg/kg	No	[redacted]-UK	[redacted] 501775]	4.2.3.2-1
A 5-Week Toxicity Study of GEN3013 by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Bioavailability, Local Tolerance, and a 6-Week Recovery Period	Monkey/Cynomolgus	IV, infusion IV, infusion SC	Weekly × 5 1 day[a] 2 day[a, b]	IV: 0.01, 0.1, 1 mg/kg IV: 0.1, 1 mg/kg SC: 0.1, 1, 10 mg/kg	Yes	[redacted]-UK	[redacted] 503484]	4.2.3.2-2

a　Single dose IV or SC groups were included in the study designs of the repeat-dose studies; these single-dose studies are presented with their respective repeat-dose main study.

b　In this study, epcoritamab (GEN3013) was administered SC on Days 1 and 29; toxicokinetics were evaluated on Day 1 (single dose); local tolerance was evaluated for the Days 1 and 29 SC injection sites.

3.　トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: Epcoritamab

Study type / Study Number	Single-Dose Toxicity Study / [redacted]529668			
Species / Sex	Cynomolgus Monkey / Female (n=2)			
Method of administration	Intravenous Infusion (30 min)			
Dose (mg/kg)	0.01	0.1	1	10
C_{max} (μg/mL) [a]	0.00898	0.422	32.7	326
$AUC_{0\text{-}7d}$ (μg·day/mL) [a]	0.00114	0.0620	17.6	540

a　Units of drug amount changed to μg from ng in the study report.　AUC: area under the concentration-time curve from time zero to time t=7 days ($AUC_{0\text{-}7d}$); C_{max}: the maximum observed concentration observed after dosing.

Test Article: Epcoritamab

Study type / Study No.	Repeat-Dose Toxicity Study (Dose Range Finding Study) / [redacted]501775				
Species/Gender	Cynomolgus Monkey / Female (n=2)				
Method of administration	Intravenous Infusion (30 min), Single Dose + Priming				
Dose (mg/kg)	0.01 (priming) + 1 (target)				
C_{max} (μg/mL) [a]	51.6				
$AUC_{0\text{-}7d}$ (μg·day/mL) [a]	68.2				
Method of administration	Subcutaneous Injection, Single Dose				
Dose (mg/kg)	0.01	0.1	1	10	20
C_{max} (μg/mL) [a]	0.000625	0.0485	5.43	62.1	69.2
$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg·day/mL) [a]	0.00467 (n=1)	0.385	73.0	654	694

a　Units of drug amount changed to μg from ng in the study report.　AUC: area under the concentration-time curve from time zero to time t=7 days ($AUC_{0\text{-}7d}$); or from time zero to time to infinity ($AUC_{0\text{-}inf}$); C_{max}: the maximum observed concentration observed after dosing.

Test Article: Epcoritamab

Study type / Study No.	Repeat-Dose Toxicity Study (Dose Range Finding Study) / [redacted]501775			
Species/Gender	Cynomolgus Monkey / Female (n=2)			
Method of administration	Intravenous Infusion (30 min), Repeated Dose			
Dose (mg/kg) /Animal No.	0.01 / 1501			
Administration day	1st dose	2nd dose	3rd dose	4th dose
C_{max} (μg/mL) [a]	0.108	0.130	0.145	0.0100
$AUC_{0\text{-}7d}$ (μg·day/mL) [a]	0.00934	0.0112	0.0122	0.00538
Dose (mg/kg) /Animal No.	0.01 / 1502			
Administration day	1st dose	2nd dose	3rd dose	4th dose
C_{max} (μg/mL) [a]	0.121	0.140	0.0700	0.0163
$AUC_{0\text{-}7d}$ (μg·day/mL) [a]	0.0103	0.0120	0.00603	0.00160
Dose (mg/kg) /Animal No.	0.1 / 2501			
Administration day	1st dose	2nd dose	3rd dose	4th dose
C_{max} (μg/mL) [a]	1.95	3.74	0.253	0.0360
$AUC_{0\text{-}7d}$ (μg·day/mL) [a]	0.232	1.85	0.884	0.00912
Dose (mg/kg) /Animal No.	0.1 / 2502			
Administration day	1st dose	2nd dose	3rd dose	4th dose
C_{max} (μg/mL) [a]	3.74	2.52	0.477	0.0310
$AUC_{0\text{-}7d}$ (μg·day/mL) [a]	1.85	0.708	NC	NC
Dose (mg/kg) /Animal No.	1 / 3501			
Administration day	1st dose	2nd dose	3rd dose	4th dose
C_{max} (μg/mL) [a]	33.5	52.2	25.7	29.2
$AUC_{0\text{-}7d}$ (μg·day/mL) [a]	32.5	65.1	6.26	10.5
Dose (mg/kg) /Animal No.	1 / 3502			
Administration day	1st dose	2nd dose	3rd dose	4th dose
C_{max} (μg/mL) [a]	46.6	75.8	79.8	69.7
$AUC_{0\text{-}7d}$ (μg·day/mL) [a]	52.0	107	142	174

a　Units of drug amount changed to μg and units of time to days from ng and h in the study report. AUC: area under the concentration-time curve from time zero to time t=7 days ($AUC_{0\text{-}7d}$); C_{max}: the maximum observed concentration observed after dosing.

NC: Parameter could not be calculated.

Test Article: Epcoritamab

Study type / Study Number	Repeat-Dose Toxicity Study (GLP Study) / [redacted] 503484					
Species	Cynomolgus Monkey (n=3)					
Method of administration	Intravenous Infusion (30 min), Single dose					
Dose (mg/kg)	0.1		1		—	
Sex	Male	Female	Male	Female	—	—
C_{max} (μg/mL) [a]	1.61	1.30	21.6	28.4	—	—
AUC_{0-t} (μg·day/mL) [a]	0.550	0.177	25.5	26.5	—	—
Method of administration	Subcutaneous Injection					
Dose (mg/kg)	0.1		1		10	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
C_{max} (μg/mL) [a]	0.244	0.111	2.10	1.67	35.9	35.1
AUC_{0-t} (μg·day/mL) [a]	1.54	0.671	21.6	17.1	389	385

a　Units of drug amount changed to μg and units of time to days from ng and h in the study report. AUC: area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration (AUC_{0-t}); C_{max}: the maximum observed concentration observed after dosing.

—: Not applicable

Test Article: Epcoritamab

Study type / Study Number	Repeat-Dose Toxicity Study (GLP study) / [redacted]503484					
Species	Cynomolgus Monkey (n=5)					
Method of administration	Intravenous Infusion (30 min), Repeated dose					
Dose (mg/kg)	0.01		0.1		1	
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Day 1						
C_{max} (µg/mL) [a]	0.102	0.0957	1.61	1.77	24.0	24.6
AUC_{0-t} (µg·day/mL) [a]	0.00671	0.00596	0.234	0.299	23.9	27.0
Day 15						
C_{max} (µg/mL) [a]	--	--	--	--	23.6	27.0
AUC_{0-t} (µg·day/mL) [a]	--	--	--	--	44.2	49.2
Day 29						
C_{max} (µg/mL) [a]	--	--	--	--	37.2 (n=2)	28.5
AUC_{0-t} (µg·day/mL) [a]	--	--	--	--	100 (n=2)	82.5

a Units of drug amount changed to µg and units of time changed to day from ng and h in the study report. AUC: area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last observed quantifiable concentration (AUC_{0-t}); C_{max}: the maximum observed concentration observed after dosing

--: All animals at 0.01 and 0.1 mg/kg, and 3/5 males at 1 mg/kg exhibited positive ADA responses and therefore were excluded from descriptive statistic.

4. 被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: Epcoritamab

Batch No. (concentration)	Purity (%)	Specified Impurities		Other	Study Number	Type of Study
		Endotoxin	Bioburden	FITC Degree of Labeling		
被験物質 2* (2.359 mg/mL)	99%	-	-	-	[[redacted] 529668]	Exploratory Single-Dose Intravenous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys (non-GLP)
被験物質 3* (133.813 mg/mL)	>99% monomer	-	-	-	[[redacted] 501775]	Dose Range-Finding Study by Intravenous and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Recovery (non-GLP)
被験物質 1* (57.1 mg/mL)	97.1% monomer 2.7% Aggregates 0.22% LMW	0.015 EU/mg	<1 CFU/mL	-	[[redacted] 503484]	5-Week Toxicity Study by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Bioavailability, Local Tolerance, and a 6-Week Recovery Period (GLP)
被験物質 4* (0.546 mg/mL)	75% by SDS-PAGE (non-reduced)	-	-	2.5	[[redacted] 8361457]	Development of IHC Method for Tissue Cross-Reactivity Study with epcoritamab in a Selected Panel of Human Tissues (non-GLP)
被験物質 4* (0.546 mg/mL)	75% by SDS-PAGE (non-reduced)	-	-	2.5	[[redacted] 8361454]	Tissue Cross-Reactivity of epcoritamab with a Selected Panel of Human and Cynomolgus Monkey Tissues (GLP)
被験物質 1* (57.1 mg/mL)	97% monomer 2.7% Aggregates 0.22% LMW	0.015 EU/mg	<1 CFU/mL	-	[32318]	ProStorm® Cytokine Release Assay (30 donor) (non-GLP)
被験物質 1* (57.1 mg/mL)	97% monomer 2.7% Aggregates 0.22% LMW	0.015 EU/mg	<1 CFU/mL	-	[[redacted] 301352]	In Vitro Hemolytic Potential and Plasma Compatibility Assessment (GLP)

＊新薬承認情報提供時に置換

FITC: fluorescein isothiocyanate; -: no data or not applicable

5.　単回投与毒性試験

Test Article: Epcoritamab

Species, Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Monkey, Cynomolgus (non-GLP)	IV, infusion (30 minutes) (PBS/solution)	0.01, 0.1, 1, 10 [a]	Females, 2/group	10	>10 mg/kg	Vomiting between 14 min and 1.75 hours post dose at 0.1, 1 or 10 mg/kg. Decreased activity, hunched posture in one animal at 10 mg/kg ~1.5 hours post dose; this animal remained quieter than normal although alert and responsive for up to 6 hours after dosing. Target-mediated clearance. Based on $nAUC_{0\text{-}7d}$, a super-proportional increase in exposure observed at doses ≤1 mg/kg with dose-proportional increases between 1 and 10 mg/kg. IgM isotype ADA responses observed in animals at 0.01 or 0.1 mg/kg; IgG (G1m[a] subtype) ADA response observed in all animals. Decreases in total B cells ($CD19^+$) at all doses on Day 2. Extent of depletion and time for recovery was dose dependent. Markedly high total leukocyte and neutrophil counts observed immediately after dosing and up to 4 hours postdose at ≤1 mg/kg with recovery by Day 8. Low lymphocyte, monocyte, eosinophil, and basophil counts observed immediately after dosing and up to 4 hours post dose at ≤10 mg/kg with evidence of recovery by Day 8. High reticulocyte count observed 7 days post dose, associated with low hemoglobin concentrations, red blood cell counts and hematocrit in some animals. Transient dose-related decreases in the total T-cell population ($CD4^+CD8^+$) and some subpopulations; recovery of T cells observed by 4 days post dose. Cytokine release (one or more cytokine) observed at all dose levels, and was transient with maximum levels	[[redacted]529668]

Species, Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
						generally observed within 6 hours post dose, returning to at or near baseline within 24 hours. Increases in TNFα, IL-1β, and IL-4 plasma concentrations were slight, with more moderate, generally dose-related increases in IFNγ, IL-6, and IL-8. Moderate to marked decreased cellularity of the germinal centers in the mandibular and mesenteric lymph nodes and spleen of the animals at 1 or 10 mg/kg on Day 29 and 36 respectively; finding not observed at the same doses on Day 95.	

a　Necropsies at Day 29, 36, or 95

6.　反復投与毒性試験：主要な試験以外の試験

Test Article: Epcoritamab

Species, Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Monkey, Cynomolgus (non-GLP)	IV, infusion (30 minutes) (PBS/solution)	Weekly × 4 (Days 1, 8, 15, 22)	0.01, 0.1, 1	Females, 2/group	1	Epcoritamab as a single IV dose at 1 mg/kg with a priming dose of 0.01 mg/kg or as once weekly IV doses of up to 1 mg/kg to cynomolgus monkeys was generally well tolerated and associated with changes in hematology and alterations in lymphocyte subpopulations. Incidents of vomit were observed after dosing at all dose levels occasionally correlating with increased cytokine levels. Microscopic findings included minimal or mild increased hematopoiesis in the femur and/or sternum marrow at 0.01 + 1 or 1 mg/kg and moderate or marked decreased lymphoid cellularity of follicles and marginal zone in the spleen and mild inflammation in the kidney at 0.01/1 mg/kg. Epcoritamab as a single SC dose up to 20 mg/kg was also associated with incidents of vomit after dosing occasionally correlating with increased cytokine levels. Hematology changes and alterations in lymphocyte subpopulations were observed at all dose levels. Minimal or mild lymphocytic infiltration in the sternum and/or femur marrow was observed at all dose levels. There were two decedents in the SC dose groups that were attributed to either severe anemia (20 mg/kg, 57 days post dose) or a suspected infectious process and poor overall general condition (1 mg/kg, Day 135) and were of unclear relationship to epcoritamab. Target-mediated clearance was observed in the TK profile. Following IV dosing, a super-proportional increase in exposure was observed with increasing dose up to the high dose of 1 mg/kg. At 1 mg/kg, an increase in exposure was observed after repeated weekly dosing, indicating accumulation of the test item. Plasma concentration-time	[[redacted]501775]
	IV, infusion (30 minute) (PBS/solution)	Priming Dose (Day 1) + Target Dose (Day 2)	0.01 + 1	Females, 2/group	0.01 + 1		
	SC (30 mmol/L acetate buffer, pH 5.5 + 150 mmol/L sorbitol)	Single Dose	0.01, 0.1, 1, 10, 20	Females, 2/group	10		

Species, Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
						profiles after multiple doses were affected by ADA responses, except for one animal at 1 mg/kg. In this animal it was observed that repeated dose resulted in an increase in $AUC_{0\text{-}7d}$, indicating potential for accumulation. After SC administration, C_{max} was reached between 0.5 and 7 days after dosing. A super-proportional increase in exposure to epcoritamab was seen with increasing dose up to 1 mg/kg. A dose-proportional increase in exposure was observed between 1 mg/kg and 10 mg/kg, while observed exposures did not increase further between 10 and 20 mg/kg. Cytokine analyses indicated increases in TNFα, and IL-15 plasma concentrations, with notably higher dose-dependent increases in IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, and IFNγ following either IV or SC administration. Cytokine release (one or more cytokine) was observed at all dose levels, occurring primarily after the first dose, and returning to at or near baseline levels within 24 hours post dose. Peak levels for most cytokines at a comparable dose were generally lower following SC administration relative to IV administration. This was particularly notable for MCP-1, but not for IFNγ. In addition, IV administration of a priming dose (0.01 mg/kg) on Day 1 followed by a dose of 1 mg/kg on Day 2, was associated with much lower levels of cytokine release overall.	

7.　反復投与毒性試験：主要な試験

Test Article: Epcoritamab (batch no　被験物質 1*　)

Report Title: A 5-Week Toxicity Study of GEN3013 by Intravenous Infusion and Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with Bioavailability, Local Tolerance, and a 6-Week Recovery Period		
Species: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** Group 1 to 4 - weekly dosing (necropsy Day 36) Group 5 and 6 - Day 1 (necropsy Day 36) Group 7 to 9 - Days 1 and 29 (necropsy Day 33)	**Location in CTD:** 4.2.3.2-2
Initial Age: 4 to 6 years	**Duration of Post dose:** Groups 1 and 4 - 6 weeks (necropsy Day 72)	**Study Number:** [[redacted] 503484]
Date of First Dose: 29 March 2017	**Method of Administration:** IV (30-minute infusion at 10 mL/kg, administered once every week [Groups 1 to 4 - Days 1, 8, 15, 22 and 29] or once only [Groups 5 and 6 - Day 1]); SC at 0.2 mL/kg on Days 1 and 29	**GLP Compliance**: Yes
	Vehicle/Formulation: IV - 0.9% Saline SC - 30 mmol/L acetate buffer, 150 mmol/L sorbitol pH 5.5	
Special Features: ADA, Cytokines and Immunophenotyping (whole blood, lymph nodes, and bone marrow)		
No-Observed-Adverse-Effect Level: 0.1 mg/kg IV and 10 mg/kg SC		

Dose Level (mg/kg)	**0**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Route	**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**
Toxicokinetics:								
$AUC_{0\text{-}t}$ (μg·day/mL)								
Day 1	NA	NA	0.00671	0.00596	0.234	0.299	23.9	27.0
Day 15	NA	NA	NR[a]	NR[a]	NR[a]	NR[a]	44.6	49.2
Day 29	NA	NA	NR[a]	NR[a]	NR[a]	NR[a]	100	82.5
C_{max} (μg/mL)								
Day 1	NA	NA	0.102	0.0957	1.61	1.77	24.0	24.6
Day 15	NA	NA	NR[a]	NR[a]	NR[a]	NR[a]	23.6	27.0
Day 29	NA	NA	NR[a]	NR[a]	NR[a]	NR[a]	37.2	28.5

a　All animals dosed at 0.01 or 0.1 mg/kg on Days 15 and 29 exhibited a positive ADA response, no TK parameters reported.

Dose Level (mg/kg)	**0**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Route	**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**
Anti-drug Antibodies								
Pretreatment	NA	NA	-	-	-	-	-	-
Day 15	NA	NA	3/3	3/3	3/3	3/3	1/5	0/5
Day 22	NA	NA	3/3	3/3	3/3	3/3	3/5	0/5
Day 29	NA	NA	3/3	3/3	3/3	3/3	3/5	0/5
Day 72[b]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/2	0/2
Noteworthy Findings								
Mortality	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations								
Decreased activity	-	-	-	-	-	-	5/5	5/5
Hunched posture	-	-	-	-	-	-	5/5	5/5
White or yellow foamy/yellow liquid vomit	-	-	-	-	1/3	-	2/5	3/5
Body Weight (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiology	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology								
White blood cells ($\times 10^9$/L)								
Pretreatment	10.384	11.202	10.350	9.500	8.837	8.260*	13.288	8.274*
Day 8	10.558	12.394	11.360	10.513	11.753	11.753	21.544***	14.216
Day 15	9.944	12.560	11.317	13.223	16.290*	15.627	18.960***	14.974
Day 22	11.840	12.732	11.875	11.880	16.910	12.413	18.016*	14.714
Day 29	9.962	11.268	9.663	12.303	9.863	10.317	9.802	7.856**
Day 36	10.650	11.938	12.023	11.157	9.513	8.837	9.324	7.552**
Lymphocyte count ($\times 10^9$/L)								

b　Recovery animals only (2 males and 2 females in group 1 [vehicle] and group 4 [1 mg/kg]). Termination Day 72.

Dose Level (mg/kg)	0		0.01		0.1		1.0	
Route	IV (Q1W × 5)		IV (Q1W × 5)		IV (Q1W × 5)		IV (Q1W × 5)	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	M (3 + 2)	F (3 + 2)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)	M (3 + 2)	F (3 + 2)
Pretreatment	4.454	6.254	4.957	6.020	5.153	5.217	4.756	5.168
Day 8	5.730	7.302	5.380	6.800	7.487	7.840	12.892**	6.234
Day 15	5.204	7.276	6.210	8.213	11.907**	10.437	11.972**	8.752
Day 22	5.868	7.268	8.090	7.560	11.890	8.487	11.196*	7.744
Day 29	4.894	6.328	5.223	5.603	6.673	7.117	5.700	3.930*
Day 36	5.346	6.880	5.120	6.493	6.713	5.937	4.822	3.496***
Monocyte count (× 10^9/L)								
Pretreatment	0.372	0.408	0.320	0.417	0.227	0.303	0.318	0.312
Day 8	0.414	0.476	0.320	0.290	0.547	0.347	0.828*	0.520
Day 15	0.350	0.508	0.363	0.353	0.423	0.490	0.854*	0.918**
Eosinophil count (× 10^9/L)								
Pretreatment	0.236	0.256	0.350	0.517	0.247	0.137	0.152	0.216
Day 8	0.384	0.474	0.647	0.777	1.277	0.393	1.058	0.982
Day 15	0.310	0.558	1.110	0.820	1.097	0.567	1.276	1.356
Basophil count (× 10^9/L)								
Pretreatment	0.056	0.074	0.057	0.070	0.050	0.047	0.082	0.060
Day 8	0.054	0.084	0.067	0.067	0.130	0.123	0.366**	0.136
Day 15	0.052	0.086	0.083	0.113	0.227	0.213	0.760**	0.924**
Hemoglobin (g/dL)								
Pretreatment	14.38	14.04	14.30	13.70	14.57	12.90	14.08	14.00
Day 8	14.28	12.82	13.83	12.53	13.13	12.07	12.54*	11.90
Day 15	13.92	12.30	13.33	12.57	12.10*	11.40	12.04**	11.16
Day 22	13.50	12.22	13.10	12.60	12.37	11.50	12.10*	11.74
Hematocrit (L/L)								
Pretreatment	0.4836	0.4788	0.4787	0.4640	0.4953	0.4413	0.4758	0.4888
Day 8	0.4888	0.4354	0.4697	0.4273	0.4473	0.4170	0.4330*	0.4220
Day 15	0.4664	0.4210	0.4530	0.4263	0.4167*	0.3927	0.4086**	0.3940
Day 22	0.4574	0.4258	0.4255	0.4320	0.4237	0.4017	0.4088**	0.4202
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-

Dose Level (mg/kg)	**0**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Route	**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology – Day 36 (n=3) [c]								
Spleen								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	3
Increased cellularity, lymphoid, follicle								
Mild	0	0	1	0	1	0	0	0
Mandibular Lymph Node								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	3
Increased cellularity, lymphoid, follicle								
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	1	0	1	0	0	0
Mesenteric Lymph Node								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	3

c　Main toxicity animals only (3 males and 3 females in group 1 [0 mg/kg], 2 [0.01 mg/kg], 3 [0.1 mg/kg] and 4 [1.0 mg/kg]). Termination Day 36.

Dose Level (mg/kg)	**0**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Route	**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**
Histopathology – Day 36 (n=3) [c]								
Axillary Lymph Node								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Mild	0	0	0	0	0	2	3	3
Inguinal Lymph Node								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Mild	0	0	0	0	0	1	3	3
GALT								
Decreased cellularity, lymphoid								
Mild	0	0	0	0	0	0	2	3
Histopathology – Day 72 (n=2)[b]								
Spleen								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Mild	0	0	NA	NA	NA	NA	0	1
Mandibular Lymph Node								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	1	0
Mild	0	0	NA	NA	NA	NA	1	2
Mesenteric Lymph Node								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Mild	0	0	NA	NA	NA	NA	1	2
Moderate	0	0	NA	NA	NA	NA	1	0

Dose Level (mg/kg)	**0**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Route	**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**
Histopathology – Day 72 (n=2)[b]								
Axillary Lymph Node								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Mild	0	0	NA	NA	NA	NA	0	2
Inguinal Lymph Node								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Mild	0	0	NA	NA	NA	NA	0	2
GALT								
Decreased cellularity, lymphoid, follicle								
Mild	0	0	NA	NA	NA	NA	0	1

Dose Level (mg/kg)	**0**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Route	**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**
Immunophenotyping[d]								
Total T cells – peripheral blood (cells/μL)								
Pretreatment	3308	2824	3987	2050	2893	1510	2674	2066
Day 1 (2 h)	1287	1969	94	115	29	13	16	20
Day 4	2959	4928	2062	3054	2191	1859	2006	2019
Total B cells – peripheral blood (cells/μL)								
Pretreatment	760	528	1724	566	566	248	615	649
Day 1 (2 h)	332	502	9	3	3	0	0	1
Day 4	170	681	42	162	5	6	2	4
Day 8 (Predose)	406	557	268	106	12	6	9	1
Day 15 (Predose)	176	643	197	592	73	21	1	10
Day 22 (Predose)	790	603	1059	579	609	23	3	1
Day 29 (Predose)	182	620	281	662	127	38	9	5
Day 36	243	508	399	560	191	16	2	0
Day 43[b]	419	343	NA	NA	NA	NA	0	0
Day 50[b]	457	530	NA	NA	NA	NA	1	1
Day 57[b]	439	937	NA	NA	NA	NA	6	0
Day 64[b]	387	401	NA	NA	NA	NA	3	1
Day 72[b]	395	308	NA	NA	NA	NA	29	1
Total B cells– lymph nodes (Percentage of CD45 + lymphocytes)								
Day 36[c]	2.87	3.81	4.76	2.88	2.65	1.38	1.18	0.56
Day 72[b]	1.48	6.63	NA	NA	NA	NA	0.35	2.5

Dose Level (mg/kg)	**0**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Route	**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**
Cytokine Analysis								
IL-2 (pg/mL)								
Pretreatment	15.1		15.3		15.7		16.8	
Day 1 (2 h)	11.1		34.1		375.0		1026.1	
Day 1 (4 h)	5.2		5.0		74.6		379.0	
Day 1 (6 h)	9.4		7.4		29.3		158.6	
Day 1 (12 h)	7.9		8.1		8.6		11.6	
Day 1 (24 h)	15.0		13.2		13.0		7.4	
IL-6 (pg/mL)								
Pretreatment	6.0		7.8		9.7		7.8	
Day 1 (2 h)	6.9		724.2		3161.7		6181.0	
Day 1 (4 h)	6.2		220.2		3695.0		7081.4	
Day 1 (6 h)	13.0		157.8		3485.0		7801.3	
Day 1 (12 h)	10.3		44.8		734.3		3363.8	
Day 1 (24 h)	8.1		18.2		24.5		259.9	

Dose Level (mg/kg)	**0**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Route	**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**
Cytokine Analysis								
IL-8 (pg/mL)								
Pretreatment	72.7		552.0		298.0		271.3	
Day 1 (2 h)	110.9		1414.0		4205.0		6225.0	
Day 1 (4 h)	118.8		403.3		1238.3		2513.9	
Day 1 (6 h)	116.5		704.2		634.7		2192.7	
Day 1 (12 h)	105.7		450.1		263.6		343.7	
Day 1 (24 h)	95.3		312.3		136.4		139.8	
IL-10 (pg/mL)								
Pretreatment	79.1		127.4		134.5		117.6	
Day 1 (2 h)	47.3		1034.7		4403.3		5215.0	
Day 1 (4 h)	51.9		190.5		2183.3		4562.0	
Day 1 (6 h)	109.4		219.2		4630.0		11281.0	
Day 1 (12 h)	55.7		96.7		3181.7		13589.0	
Day 1 (24 h)	56.2		154.1		227.5		520.9	
IFNγ (pg/mL)								
Pretreatment	16.0		27.4		29.1		26.0	
Day 1 (2 h)	18.3		106.3		324.2		536.5	
Day 1 (4 h)	11.7		68.3		332.2		649.8	
Day 1 (6 h)	17.3		54.8		281.2		611.6	
Day 1 (12 h)	11.8		17.9		73.4		182.4	
Day 1 (24 h)	16.7		32.9		24.8		31.8	
TNFα (pg/mL)								
Pretreatment	86.3		171.9		170.2		173.1	
Day 1 (2 h)	71.9		231.7		1132.8		1573.9	
Day 1 (4 h)	67.0		28.2		72.2		97.4	
Day 1 (6 h)	58.0		76.1		80.0		64.5	
Day 1 (12 h)	63.8		87.8		77.0		72.0	
Day 1 (24 h)	92.9		234.4		148.9		90.2	

Dose Level (mg/kg)	**0**		**0.01**		**0.1**		**1.0**	
Route	**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**		**IV (Q1W × 5)**	
Gender and Number of Animals (Main + Recovery)	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3 + 2)**	**F (3 + 2)**
Cytokine Analysis								
MCP-1 (pg/mL)								
Pretreatment	148.8		164.3		154.3		170.8	
Day 1 (2 h)	261.8		16306.7		84800.0		98656.0	
Day 1 (4 h)	180.5		26761.7		390666.7		506083.0	
Day 1 (6 h)	228.9		10166.7		103600.0		294333.3	
Day 1 (12 h)	332.3		1450.5		4654.8		19301.0	
Day 1 (24 h)	208.7		410.0		1493.8		2428.0	

Dose Level (mg/kg)	**0.1**		**1.0**		**0 + 0.1**		**0 + 1.0**		**0 + 10**	
Route	**IV (SD)**		**IV (SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**	
Gender (number of animals)	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**
Toxicokinetics										
$AUC_{0\text{-}t}$ (μg·day/mL)										
Day 1	0.550	0.177	25.5	26.5	1.54	0.671	21.6	17.1	389	385
C_{max} (μg/mL)										
Day 1	1.61	1.30	21.6	28.4	0.244	0.111	2.10	1.67	35.9	35.1
Anti-drug Antibodies										
Pretreatment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 15	3/3	3/3	0/3	0/2	2/3	3/3	1/3	2/3	0/3	0/3
Day 22	3/3	3/3	1/3	0/2	2/3	3/3	2/3	3/3	1/3	0/3
Day 29	3/3	3/3	1/3	1/2	2/3	3/3	2/3	3/3	1/3	0/3
Noteworthy Findings										
Mortality	0	0	0	1[e]	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations										
Decreased activity	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Hunched posture	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Yellow liquid vomit	-	-	2/3	-	-	-	-	-	-	-
White foamy vomit	-	-	-	-	1/3	-	-	-	-	-
White or clear liquid vomit	-	-	-	-	-	-	1/3	1/3	2/3	3/3
Local/generalized reddened skin	-	-	-	-	1/3	2/3	2/3	2/3	2/3	-
Uncoordinated movements	-	-	-	-	1/3	-	-	1/3	3/3	2/3
Body Weight (%)	-	-	-	--	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	--	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiology	-	--	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology										
White blood cells ($\times 10^9$/L)										

Dose Level (mg/kg)	**0.1**		**1.0**		**0 + 0.1**		**0 + 1.0**		**0 + 10**	
Route	**IV (SD)**		**IV (SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**	
Gender (number of animals)	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**
Pretreatment	11.603	8.323	10.980	5.800	10.460	8.313	9.013	7.627	8.467	9.250
Day 8	21.423	12.233	16.650	13.255	13.437	9.430	14.247	19.437	15.203	15.897
Day 15	16.237	16.377	18.063	15.810	17.130	14.210	15.300	17.093	15.080	19.787
Day 22	15.987	12.643	15.813	11.625	18.777	12.627	15.363	12.147	11.767	11.807
Lymphocyte count (× 10^9/L)										
Pretreatment	3.547	5.443	2.977	3.443	4.463	4.193	4.153	4.500	4.517	5.800
Day 8	10.830	8.607	8.300	5.110	5.800	3.393	4.130	6.913	7.383	8.100
Day 15	9.170	11.913	11.433	10.980	10.340	9.403	8.063	10.607	6.953	8.930
Day 22	9.180	8.553	8.563	6.790	8.420	6.357	7.197	7.240	6.497	5.800
Monocyte count (× 10^9/L)										
Pretreatment	0.263	0.243	0.330	0.243	0.357	0.360	0.383	0.393	0.343	0.337
Day 8	0.550	0.330	0.463	0.425	0.503	0.560	0.360	0.513	0.657	0.790
Day 15	0.343	0.300	0.747	0.720	0.840	0.703	0.847	1.040	0.963	0.640
Day 22	0.373	0.280	0.613	0.435	0.713	0.483	0.897	0.493	0.823	0.577
Eosinophil count (× 10^9/L)										
Pretreatment	0.333	0.207	0.323	0.183	0.103	0.163	0.553	0.307	0.200	0.147
Day 8	1.657	0.923	1.223	0.710	1.000	0.617	1.017	0.690	0.710	0.390
Day 15	1.203	0.817	1.143	1.885	1.323	0.527	2.073	1.113	1.167	1.057
Day 22	1.173	0.533	0.860	1.165	0.970	0.613	1.653	0.653	1.030	0.443
Basophil count (× 10^9/L)										
Pretreatment	0.060	0.053	0.043	0.030	0.060	0.040	0.057	0.043	0.037	0.070
Day 8	0.260	0.083	0.173	0.140	0.070	0.050	0.110	0.140	0.123	0.143
Day 15	0.153	0.163	0.743	0.555	0.823	0.090	1.007	1.067	0.357	0.217
Day 22	0.070	0.090	0.063	0.090	0.110	0.060	0.050	0.043	0.040	0.060
Hemoglobin (g/dL)										
Pretreatment	14.90	13.00	14.33	14.13	15.07	13.83	14.47	13.37	14.37	13.37
Day 8	13.77	11.90	12.63	12.40	13.27	12.00	12.33	11.03	12.43	11.30
Day 15	13.73	11.80	12.57	11.75	13.10	12.73	11.87	11.00	11.87	11.27
Day 22	13.73	12.27	12.90	12.25	13.37	12.30	12.17	11.27	12.50	11.57
Hematocrit (L/L)										

Dose Level (mg/kg)	**0.1**		**1.0**		**0 + 0.1**		**0 + 1.0**		**0 + 10**	
Route	**IV (SD)**		**IV (SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**	
Gender (number of animals)	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**
Pretreatment	0.5017	0.4360	0.4797	0.4803	0.5103	0.4593	0.4790	0.4680	0.4783	0.4403
Day 8	0.4780	0.4117	0.4410	0.4250	0.4410	0.3977	0.4037	0.3743	0.4070	0.3767
Day 15	0.4683	0.4050	0.4297	0.4015	0.4437	0.4317	0.3950	0.3823	0.3990	0.3767
Day 22	0.4697	0.4240	0.4327	0.4320	0.4540	0.4210	0.4157	0.3990	0.4277	0.3910
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology – Day 33 (SC) or 36 (IV)										
Spleen										
Decreased cellularity, lymphoid, follicle										
Mild	1	0	2	1	3	1	3	2	3	3
Moderate	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Mandibular Lymph Node										
Decreased cellularity, lymphoid, follicle										
Mild	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	3	0	1	1	3	3	3	2
Mesenteric Lymph Node										
Decreased cellularity, lymphoid, follicle										
Mild	1	0	1	2	1	1	0	0	0	0
Moderate	0	0	2	0	0	0	3	3	3	3
Lymph Node										
Decreased cellularity, lymphoid, follicle										
Mild	-	-	-	-	-	1	-	-	-	0
Pigmented macrophage										
Minimal	-	-	-	-	-	0	-	-	-	1
Histopathology – Day 33 (SC) or 36 (IV)										
Axillary Lymph Node										
Decreased cellularity, lymphoid, follicle										
Mild	1	0	3	2	1	1	3	3	3	3

Dose Level (mg/kg)	**0.1**		**1.0**		**0 + 0.1**		**0 + 1.0**		**0 + 10**	
Route	**IV (SD)**		**IV (SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**	
Gender (number of animals)	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**
Inguinal Lymph Node										
Decreased cellularity, lymphoid, follicle										
Mild	1	0	3	2	1	1	3	3	3	3
GALT										
Decreased cellularity, lymphoid										
Mild	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
Additional Examinations										
Immunophenotyping[d]										
Total T -cells – peripheral blood (cells/µL)										
Pretreatment	2152	2201	2110	1251	3144	3151	2979	3554	4114	4075
Day 1 (2 h)	36	33	15	15	154	129	72	132	31	30
Day 4	3098	2531	2664	921	1203	846	849	593	2291	1468
Total B -cells – peripheral blood (cells/µL)										
Pretreatment	535	466	620	374	466	620	654	740	1005	655
Day 1 (2 h)	8	2	0	1	6	12	5	5	1	1
Day 4	7	11	3	2	1	1	1	1	3	2
Day 8	117	4	3	5	1	2	0	5	0	5
Day 15	83	361	2	16	8	29	9	8	2	1
Day 22	393	433	2	3	39	93	6	6	3	1
Day 29	98	410	6	2	47	64	2	8	1	1
Day 33 (SC) or 36 (IV)	171	407	16	0	72	148	1	2	0	1
Total B cells - lymph nodes (Percentage of CD45 + lymphocytes)										
Day 33 (SC) or 36 (IV)	2.87	4.34	0.70	1.76	2.02	2.75	0.54	1.15	0.73	1.42
Cytokine Analysis										
IL-2 (pg/mL)										
Pretreatment	16.8		17.0		13.3		16.0		13.0	
Day 1 (2 h)	429.3		1109.3		100.1		139.4		523.5	
Day 1 (4 h)	145.0		341.8		32.2		88.1		502.7	
Day 1 (6 h)	67.8		150.5		46.5		98.9		271.6	
Day 1 (12 h)	9.2		6.5		12.6		8.4		17.7	

Dose Level (mg/kg)	**0.1**		**1.0**		**0 + 0.1**		**0 + 1.0**		**0 + 10**	
Route	**IV (SD)**		**IV (SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**		**SC (2 × SD)**	
Gender (number of animals)	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**	**M (3)**	**F (3)**
Day 1 (24 h)	8.1		6.7		9.6		4.6		3.2	
IL-6 (pg/mL)										
Pretreatment	6.6		6.1		9.3		9.8		5.7	
Day 1 (2 h)	3588.2		5683.3		222.5		304.0		1063.3	
Day 1 (4 h)	3958.0		7712.0		826.3		1861.2		6540.0	
Day 1 (6 h)	3742.0		8166.7		2068.0		6093.3		8606.7	
Day 1 (12 h)	1927.7		4173.2		1326.3		2510.0		5990.0	
Day 1 (24 h)	78.2		146.1		32.2		450.0		184.1	
IL-8 (pg/mL)										
Pretreatment	201.2		181.8		116.2		59.7		502.1	
Day 1 (2 h)	3600.0		6205.0		795.0		930.7		1882.8	
Day 1 (4 h)	1683.8		2362.0		500.5		1104.8		5298.0	
Day 1 (6 h)	919.5		2045.5		895.5		2329.5		4414.0	
Day 1 (12 h)	320.5		646.9		342.4		244.8		619.7	
Day 1 (24 h)	234.6		121.4		181.6		122.0		588.1	
IL-10 (pg/mL)										
Pretreatment	141.0		111.7		89.9		48.4		75.8	
Day 1 (2 h)	4165.0		5888.3		1146.5		2733.3		4331.7	
Day 1 (4 h)	3585.0		4630.0		715.0		1099.3		3066.7	
Day 1 (6 h)	7453.3		10238.3		1668.0		1831.8		9103.3	
Day 1 (12 h)	10526.7		11426.7		1935.7		3058.3		17236.0	
Day 1 (24 h)	433.2		363.8		287.7		854.0		744.2	
IFNγ (pg/mL)										
Pretreatment	15.4		33.0		23.6		16.9		21.8	
Day 1 (2 h)	424.0		1046.3		34.1		68.2		194.3	
Day 1 (4 h)	598.3		1128.5		161.6		281.4		741.3	
Day 1 (6 h)	471.0		788.3		176.2		393.3		937.3	
Day 1 (12 h)	134.8		250.3		59.2		76.9		278.5	
Day 1 (24 h)	34.0		27.3		21.9		19.4		29.1	
TNFα (pg/mL)										

Dose Level (mg/kg)	0.1		1.0		0 + 0.1		0 + 1.0		0 + 10	
Route	IV (SD)		IV (SD)		SC (2 × SD)		SC (2 × SD)		SC (2 × SD)	
Gender (number of animals)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)	M (3)	F (3)
Pretreatment	96.7		158.8		148.9		96.8		140.2	
Day 1 (2 h)	1319.8		1815.2		768.7		1035.8		4432.5	
Day 1 (4 h)	90.1		115.4		107.0		50.3		187.8	
Day 1 (6 h)	86.9		112.5		119.2		142.1		109.7	
Day 1 (12 h)	73.5		14.5		96.7		31.6		154.5	
Day 1 (24 h)	119.2		39.5		125.3		23.6		50.5	
MCP-1 (pg/mL)										
Pretreatment	125.1		106.1		140.9		119.4		141.0	
Day 1 (2 h)	42250.0		226011.7		8853.3		6405.0		33833.3	
Day 1 (4 h)	133876.7		170353.3		6340.0		5881.7		41716.7	
Day 1 (6 h)	193233.3		522500.0		93928.3		111988.3		795833.3	
Day 1 (12 h)	12465.0		79926.7		10258.3		8320.0		53650.0	
Day 1 (24 h)	1208.0		1096.8		918.5		920.0		1942.3	

NA: Not applicable; NR: Not reported; -: No noteworthy findings; Statistically significant compared with control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

a All animals dosed at 0.01 or 0.1 mg/kg on Days 15 and 29 exhibited a positive ADA response, no TK parameters reported.

b Recovery animals only (two males and two females in group 1 [vehicle] and 4 [1 mg/kg]). Termination Day 72.

c Main toxicity animals only (three males and three females in group 1 – 4). Termination Day 36.

d Total T cells and total B cells are presented only. Epcoritamab affects B and T cell populations shortly after dosing, with recovery of total T cell populations and T cell subpopulations nearly immediate, but overall B cells do not show a significant trend towards recovery during the study in all treatment groups. Below is a brief description of the changes in cell counts after treatment, including other subset populations other than total T and B cell counts:

- In peripheral blood, a decrease in total T cells, cytotoxic T cells, CD25+ cytotoxic T cells, CD69+ cytotoxic T cells, CD279+ cytotoxic T cells, T helper cells, CD25+ helper T cells, CD69+ helper T cells, and CD279+ helper T cell population was observed shortly after dosing (2 hours after dosing) in all treated male groups (whereas no similar decrease in the control group was observed). These decreases in the treated groups began to resolve immediately, with nearly complete recovery observed from Day 4 to baseline in most T cell populations. Total peripheral blood B cell counts, naive B cell populations, and memory B cell populations decreased following treatment and were generally not or were less likely to recover during the study.
- In lymph nodes, flow cytometry analysis revealed no significant findings in T cell populations in either treatment group compared with the control group. In addition, immunophenotyping of lymph nodes showed no significant difference between the control and treatment groups in all cell populations except for total and mature B cells. Slightly lower total and mature B cell counts were observed at the high dose.
- In the bone marrow, immunophenotyping revealed small changes of decreased activated CD25+ cytotoxic T cells and increased activated CD279+ cytotoxic T cells, but overall there were no significant changes in all T cell populations compared to the control group. B cell populations are not notably different between control and treated groups.

e Animal 6501F was killed prematurely on Day 2.

Abnormal findings for Animal 6501F:

- Clinical observations 1-12 hours post dose - hunched posture, decreased activity, weakness and subdued behavior
- Hematology and clinical chemistry changes 1-12 hours post dose- markedly high total leukocyte, neutrophil and basophil counts, markedly low lymphocyte count, an increased expression of CD69; prolonged prothrombin and activated partial thromboplastin times (suggesting impaired clotting); markedly high alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, γ-glutamyl transferase and creatine kinase activities (suggesting liver and muscle damage); markedly high total bilirubin (suggesting breakdown of red blood cells), urea, creatinine, triglycerides and phosphate concentrations, low total protein, albumin, globulin, sodium and chloride concentrations (suggesting impaired kidney function and fluid imbalances)
- Histopathology findings at necropsy (approximately 12 hours post dose): thymus and mandibular lymph node (degeneration, likely stress-related), and spleen (decreased lymphoid cellularity)
- Cytokine response: The key proinflammatory cytokines contributing to CRS and/or its positive feedback loop are IL-2, IL-6, IL-10, IFNγ and TNFα. Overall, IL-2 peaked at 2 hours post dose, IL-6 peaked at 4 hours post dose and remained elevated until 12 hours post dose, TNFα peaked at 4 hours post dose, IFNγ peaked at 4 hours post dose and remained elevated until 12 hours post dose, and IL-10 peaked at 12 hours post dose. Animal 6501F in particular, had the highest systemic cytokine levels in Group 6 for IL-2, IL-8, IL-15, IFNγ, TNFα and MCP-1. For IL-6 and IL-10, Animal 6501F had the second highest cytokine levels in Group 6. Interestingly, although Animal 6501F was not the highest for IL-6 or IL-10, the levels for both appeared to either remain high longer or keep increasing up to 12 hours post dose when others in Group 6 had already decreased significantly.

Gross findings were non-specific, and microscopic findings were present in the thymus and mandibular lymph node (degeneration, likely stress-related), and spleen (test item related decreased lymphoid cellularity). The cause of the animal’s demise could not be determined.

8.　In vitro 遺伝毒性試験

該当する試験は実施しなかった。

9.　In vivo 遺伝毒性試験

該当する試験は実施しなかった。

10. がん原性試験

該当する試験は実施しなかった。

11. 生殖発生毒性試験：主要な試験以外の試験

該当する試験は実施しなかった。

12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当する試験は実施しなかった。

13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

該当する試験は実施しなかった。

14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

該当する試験は実施しなかった。

15. 新生児を用いた試験

該当する試験は実施しなかった。

16. 局所刺激性

Test Article: Epcoritamab

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Monkey, Cynomolgus (GLP)	IV (0.9% saline solution) SC (30 mmol/L acetate buffer, 150 mmol/L sorbitol pH 5.5 solution)	IV: 0, 0.01, 0.1, 1 SC: 0, 0.1, 1, 10	3 males + 3 females per group	No epcoritamab-related irritation or local tolerance issues observed at the IV or SC injection sites. Findings at injection sites reflected the administration procedure.	[[redacted] 503484]

17. その他の毒性試験

Test Article: Epcoritamab

Species/Strain	Method of Administration	Concentration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Species Qualification Studies / Human, cynomolgus monkey, mouse, rat, rabbit, dog, and pig (non-GLP)	In vitro	0.03-30 µg/mL	NA	Epcoritamab showed dose-dependent binding to membrane-expressed cynomolgus monkey CD20 with an EC_{50} value that was comparable to that for human CD20 (2.80 nmol/L and 2.47 nmol/L, respectively) and to rabbit CD20 with an EC_{50} value that was about three-fold lower (6.93 nmol/L). Epcoritamab showed no binding to membrane-expressed dog, pig, rat or mouse CD20. Epcoritamab showed dose-dependent binding to membrane-expressed cynomolgus monkey CD3 with an EC_{50} value that was comparable to that for human CD3 (1.8 and 1.6 nmol/L, respectively). Epcoritamab bound to immobilized human and cynomolgus monkey CD3ε with an affinity of 16.0 and 17.0 nmol/L, respectively, as determined by bio-layer interferometry. The expression levels of CD3 and CD20 on the surface of T and B cells, respectively, in PBMC populations were comparable for cynomolgus monkeys and humans. Epcoritamab was functionally active in PBMC populations of cynomolgus monkey origin, where dose-dependent induction of T-cell activation (EC_{50} values of 0.1273 pmol/L for CD4+ and 0.0347 pmol/L for CD8+ T-cells) and cytotoxicity (EC_{50} value of 0.0093 pmol/L) were observed.	[GMB3013-034]
ProStorm® Cytokine Release Assay, Human Whole Blood (non-GLP)	In vitro	0.512 to 1 × 10^6 pg/mL	NA	Data obtained from ProStorm Cytokine Storm Assays 32318 (30 donors) and 32400 (5 donors). Epcoritamab induced significant cytokine responses in a whole blood assay, while DuoBody-CD3xctrl and 3005a only induced low cytokine responses in isolated donors. Epcoritamab induced production of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFNγ, and TNFα and showed dose-dependent S-curves above the detection threshold, with EC_{20} and EC_{50} values in the low-middle picomolar range and EC_{90} values in the high	[redacted] [32318] [redacted] [32400] [GMB3013-054]

Species/Strain	Method of Administration	Concentration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
				picomolar range. (GMB3013-054). No dose-dependent S-curves above the detection threshold were observed for IL-4 in the presence of epcoritamab.	
Evaluation of the Hemolytic Potential of Epcoritamab in Human Whole Blood and Plasma Compatibility Assessment (GLP)	In vitro	1 and 20 µg/mL	3 healthy human whole blood donors	Epcoritamab at concentrations of 1.0 µg/mL and 20 µg/mL was compatible with human whole blood and plasma. Epcoritamab was non-hemolytic in a human whole blood assay in vitro. No red blood cell clumping or plasma precipitation was observed in human whole blood at the concentrations tested.	[[redacted] 301352]
Development of an Immunohistochemical Staining Method for the Demonstration of Specific Positive Staining of epcoritamab in Control Material and Assessment of Potential Cross-Reactivity in a Selected Panel of Human Tissues (non-GLP)	In vitro	2.5, 5, 10 µg/mL FITC-labeled epcoritamab	10 selected normal frozen tissues from human; one donor for each tissue	Antigen-specific binding of epcoritamab-FITC was demonstrated in the positive control tissues (human tonsil). No similar staining was observed with a FITC-labeled (isotype) control antibody (IgG1-b12-LFLEDA-K409R-FITC) or the antibody diluent at the concentrations evaluated in the titration on a panel of tissues. Specific positive predominantly membranous staining of mononuclear cells (B/T lymphocytes) was observed with epcoritamab-FITC in other lymphoid tissues (lymph node, spleen and thymus). In addition, predominantly membranous staining of mononuclear cells (B/T lymphocytes) was also observed in interstitial cell aggregates and scattered/individual cells in the majority of other tissues examined. This staining pattern is consistent with the expected tissue distribution of B/T lymphocytes in normal tissues.	[[redacted] 8361457]

Species/Strain	Method of Administration	Concentration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Assessment of the Potential Cross-Reactivity of epcoritamab with a Selected Panel of Human and Cynomolgus Monkey Tissues (GLP)	In vitro	0.625, 1.25, 2.5 µg/mL FITC-labeled epcoritamab	~40 selected normal frozen tissues from human and cynomolgus monkey; three donors for each tissue	Antigen-specific binding of epcoritamab-FITC was demonstrated in the positive control tissues (human tonsil). No similar staining was observed with control-FITC antibody (IgG1-b12-LFLEDA-K409R-FITC) or the antibody diluent at the concentrations evaluated in the titration on a panel of tissues. Specific positive, predominantly membranous, staining of mononuclear cells (B/T lymphocytes) was observed with epcoritamab-FITC in human and cynomolgus monkey lymphoid tissues (lymph node, spleen, thymus, tonsil and mucosa-associated/gastrointestinal lymphoid tissues within gastric antrum, gastric body, duodenum, ileum and colon). In addition, predominantly membranous staining of mononuclear cells (B/T lymphocytes) was also observed in interstitial cell aggregates and scattered/individual cells in the majority of other human and cynomolgus monkey tissues examined. This staining pattern is consistent with the expected tissue distribution of B/T lymphocytes in normal tissues. The intensity of specific positive staining observed with epcoritamab-FITC was similar in the investigated human and cynomolgus monkey tissues.	[redacted] 8361454]

18. 参考文献

Barbas, C. F., 3rd, Collet, T. A., Amberg, W., Roben, P., Binley, J. M., Hoekstra, D., Cababa, D., Jones, T. M., Williamson, R. A., Pilkington, G. R., and et al. (1993). Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. J Mol Biol 230, 812-823.